UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU CHLORHYDRATE D'ADIPHENINE (TRASENTINE) ET DE QUELQUES SPASMOLYTIQUES VOISINS

THESE

pour l'obtention du grade de

Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris

présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 1955.

par

Jean-Paul GIRARD

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Membres du Jury : M.M. G. VALETTE, Président

J. COURTOIS } Examinateurs

A. QUEVAUVILLER }

1955

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DU CHLORHYDRATE D'ADIPHENINE (TRASENTINE) ET DE QUELQUES SPASMOLYTIQUES VOISINS

THESE

pour l'obtention du grade de

Docteur en Pharmacie de l'Université de Paris

présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 1955.

par

Jean-Paul GIRARD

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Membres du Jury : M.M. G. VALETTE, Président
J. COURTOIS } Examinateurs
A. QUEVAUVILLER }

1955

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. René FABRE ... Doyen, C. * , ✿ I. embre de l'Institut
R. DELABY ..... Assesseur, O.*, ✿ I.
G. CUVIER ..... Secrétaire Général, * ✿ I.
L. JEANDEL .... Secrétaire, ✿ I.
A. QUILLIOT ... Rédacteur,
Melle. M. DENNY ..... Rédactrice,
Mme. M.L. ESPINASSE Rédactrice, ✿ A.

PROFESSEURS

MM. FABRE, C. *, ✿ I. ..... Toxicologie.
DELABY, O. *, ✿ I ..... Pharmacie chimique.
PICON, O.*, ✿ I..... Chimie minérale.
MASCRE, O*, ✿ I..... Botanique.
JANOT, *, ✿ I..... Pharmacie galénique.
CHARONNAT, *, ✿ I..... Chimie organique.
VALETTE, *, ✿ I..... Pharmacodynamie.
BEDEL,*, ✿ I..... Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
PARIS,*, ✿ A..... Histoire naturelle des Médicaments simples d'origine végétale.
GUILLOT, * ✿ A..... Physique.
GAUTIER, * ✿ I..... Chimie analytique.
LAMBIN (Melle) * ✿ I..... Microbiologie.
RAOUL, ✿ A..... Zoologie appliquée.
COURTOIS, * ✿ I..... Chimie biologique.
DOMANGE, *, ✿ I..... Professeur à titre personnel.
CRETE, ✿ I..... Professeur à titre personnel.
CAVIER, ✿ I..... Professeur sans chaire.
MORETTE, * ✿ I..... Professeur sans chaire.
TRUHAUT, * ✿ I..... Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS C.*, ✿ I.

Professeurs honoraires : MM. DELEPINE, C.*, ✿ I. et
LEBEAU, C.*, ✿ I.
Membres de l'Institut

HERISSEY, C.*, ✿ I.
LAUNOY, O.*, ✿ I.
FLEURY, * ✿ I.

MAITRES DE CONFERENCES

MM. MOREAU, ✿ A..... Sciences physiques et chimiques.
GUY, ✿ A..... Sciences physiques et chimiques
GERMAIN, ✿ A..... Sciences naturelles.
PIETTE, ✿ A..... Sciences naturelles.
QUEVAUVILLER, ✿ A..... Sciences naturelles.
DAMIENS, ... Sciences physiques et chimiques.
DEYSSON, ✿ A..... Sciences naturelles.
MALANGEAU, ... Sciences appliquées.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. CORRIEZ, ✿ I..... Physique.
HARISPE, ✿ A..... Chimie générale et pharmaceutique.
MANGEOT, ✿ A..... T.P. 4ème année.
RENAULT H, ✿ A..... Chimie analytique.
DESVIGNES ..... Microbiologie.
BORY, ... Sérologie.
SAVEL, ... Biologie animale.
N., ... Chimie biologique.
N., ... Biologie végétale.

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. GOUTAREL, ✿ A..... Pharmacotechnie galénique.
WAROLIN, ... Pharmacotechnie chimique.
Melle. MORIN, ... Pharmacodynamie.

BIBLIOTHEQUE

Conservateur : M. GARNIER, *, ✿ I.

Bibliothécaires : Melle. LAVAUD, ✿ I., Mme KREHMER.

A MES GRANDS-PERES, Pharmaciens

A MES PARENTS

A MES SOEURS.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547110_0036

A MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VALETTE

Professeur de Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui me fait le grand honneur de présider la soutenance de cette thèse.
Hommage respectueux et reconnaissant.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. COURTOIS

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui a bien voulu juger ce travail.
En témoignage de mon profond respect.

A MONSIEUR A. QUEVAUVILLER

Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Qui a accepté d'examiner cette thèse.
En respectueux hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. HAZARD

Professeur de Pharmacologie et de Matière Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris.
Membre de l'Académie de Médecine.
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.
Officier de la Légion d'Honneur.

Qui n'a cessé de me prodiguer ses conseils tout au long de mes études pharmaceutiques et m'a toujours accueilli dans son Laboratoire avec la plus grande bienveillance.
En témoignage de ma profonde gratitude et de ma respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PHARMACIEN COMMANDANT J. DELGA

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce.

Qui a bien voulu m'inspirer le sujet de ce travail dont il a guidé avec une sollicitude constante les étapes successives.
Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de mon respectueux et profond attachement.

A MONSIEUR P. CHABRIER DE LA SAULNIERE

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Qui a guidé mes premiers pas dans les techniques de recherche.
Avec l'expression de ma gratitude respectueuse.

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie de l'Ecole d'Application du Service de Santé Militaire au Val de Grâce, sous la direction bienveillante de Monsieur le Pharmacien Commandant J. DELGA. Placé sous ses ordres pendant la durée de mon Service Militaire, je lui dois d'avoir pu entreprendre cette thèse. Puis, après mon retour à la vie civile, il a bien voulu continuer à guider mes travaux et me permettre de les mener à bien. Ses conseils judicieux et son appui constant m'ont été d'un précieux secours. Aussi ma reconnaissance est-elle grande et je tiens à lui faire part de toute ma gratitude.

Monsieur le Professeur G. VALETTE a eu l'extrême bienveillance de m'aider de ses conseils, de m'éclairer dans mes recherches, et m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. COURTOIS et Monsieur A. QUEVAUVILLER ont bien voulu faire partie de mon jury. Je suis heureux de les en remercier.

Monsieur le Professeur R. HAZARD qui m'a souvent accueilli dans son Laboratoire de Pharmacologie à la Faculté de Médecine, m'a permis d'y réaliser les expériences pharmacologiques de ce travail. Je désire lui exprimer ici ma respectueuse gratitude.

Que soient également remerciés Monsieur le Professeur G. PERONNET de la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée et Monsieur le Pharmacien Capitaine J. STORCK des nombreux conseils qu'il m'a donnés.

Mes remerciements les plus vifs vont à Monsieur Y. COHEN et à Madame MARCOU qui ont bien voulu m'accorder leur aide précieuse et me faire profiter de leur expérience des perfusions d'organes de Cobaye.

Je remercie Madame LAUGIER de la gentillesse et de la patience avec lesquelles elle m'a aidé lors des longues et fastidieuses séries de dosages.

C'est enfin au Laboratoire de Chimie du Val de Grâce dans son ensemble que vont mes remerciements pour l'accueil amical que j'y ai reçu dans une atmosphère de parfaite entraide.

INTRODUCTION

Jusqu'à ces dernières années, les transformations subies par les médicaments introduits dans l'organisme n'ont fait l'objet que d'un nombre peu élevé de recherches. Il suffit de relire le traité très documenté de Pharmacodynamie Générale de ZUNZ [109] paru en 1930 pour constater que peu de travaux relatifs à ce sujet avaient été effectués à cette date. Les phénomènes désignés sous le nom de tolérance ou d'intolérance n'étaient alors que très sommairement expliqués

Au contraire, les derniers exposés sur la détoxication (1) (2) rendent compte presque uniquement de travaux récents, précisant le devenir des médicaments.

TRUHAUT pense que si de telles études ont été négligées, c'est sans doute par suite des difficultés d'isolement et d'identification de ces médicaments au sein d'une masse considérable de matières organiques ou minérales.

Cependant ces recherches ont montré combien elles pouvaient être utiles, non seulement pour le dépistage des intoxications, mais aussi pour la connaissance du mécanisme d'action des toxiques qui conduit à la découverte d'antidotes et à la recherche de médicaments nouveaux.

C'est en précisant la nature des liaisons contractées par l'arsenic avec les protéines que PETERS, STOCKEN et THOMPSON [82 -83-90]

---

(1)- Voir en particulier l'ouvrage de WILLIAMS [100] , les exposés de FABRE et TRUHAUT [27] , de TRUHAUT [95] .

(2)- Par détoxication, nous entendons le métabolisme des composés étrangers à l'organisme.

ont été amenés au concept de la lésion biochimique et ont pu ainsi découvrir dans un temps record l'action antitoxique du dimercaptopropanol. On sait que cet antidote de la léwisite est si efficace que son emploi a considérablement diminué la valeur militaire de cet agressif. De même l'utilisation des sulfamides en thérapeutique résulte desrecherches de TREFOUEL, NITTI et BOVET dont le but initial était de déterminer la nature du groupement actif du prontosil

Depuis quelques années, les progrès réalisés en chimie analytique, le développement de l'enzymologie, l'utilisation des radioisotopes, ont permis, non seulement de mieux suivre la destinée des médicaments in vivo, mais encore de mieux connaître les agents qui président à leurs transformations, qui activent ou orientent les réactions auxquelles ils prennent part.

Il faut remarquer que ces enzymes catalysent parfois des réactions assez inattendues, bien éloignées de celles qu'étudient les biologistes. MAZUR [74] n'a-t-il pas mis en évidence l'activité de la phosphofluorase qui facilite la rupture de la liaison P-F du difluorophate (fluorophosphate de di-isopropyle), et AUGUSTINSSON [9] celle de la tabunase qui enlève son groupement -CN au dimétylaminocyanophosphonate d'éthyle ? Mais généralement les diastases qui assurent la détoxication, catalysent des réactions banales se manifestant de la même façon que sur des métabolites normaux. Telles sont les esterases, voisines des lipases, qui constituent le groupe des cholinesterases dont la découverte a permis de mieux comprendre la propagation de l'influx nerveux.

A ce groupe peuvent être rattachées des diastases dont l'activité porte sur des substrats étrangers à l'organisme, produits naturels ou de synthèse. Ce sont, en particulier, celles dont la présence dans certains tissus leur permettent d'hydrolyser la procaïne, l'atropine et les esters de l'acide tropique, l'héroïne, l'aspirine et les esters de l'acide salicylique. Ces enzymes sont couramment désignés sous le nom de procaïnesterase, tropanolesterase,héroïne-désacétylase, aspirinesterase, sans que toutefois l'on soit certain qu'il s'agisse d'un enzyme spécial et spécifique dans chacun des cas.

Dès qu'ils eurent connaissance des propriétés pharmacologiques du chlorure de caramiphène (Parpanit *) (1), DELGA et ANDRIEU [22] qui utilisaient ce produit en thérapeutique expérimentale constatèrent que cet ester pouvait être rapidement hydrolysé par certains tissus. Ils ne publièrent les résultats de leurs recherches qu'en 1951, peu de temps après que PULVER [87] eût rendu compte de travaux similaires. Cet auteur dénommait le nouvel enzyme "parpanitesterase".

Ayant constaté ultérieurement que d'autres esters du diéthylaminoéthanol voisins du chlorure de caramiphène, aussi bien par leur constitution chimique que par leurs propriétés pharmacologiques, pouvaient également être hydrolysés par certains tissus, nous avons repris cette étude en nous attachant surtout au comportement de l'un de ces esters : le chlorhydrate d'adiphénine (2).

Notre but était :

1º- de préciser la répartition de l'activité enzymatique entre les organes ou tissus animaux.

2º- de rechercher les relations pouvant exister entre la constitution chimique de ces esters du diéthylaminoéthanol et leur sensibilité à l'action de l'hydrolyse enzymatique.

3º- d'indiquer à quelle fraction protéinique appartenait l'apo-enzyme du ferment étudié.

4º- de localiser l'enzyme à l'intérieur de la cellule et de déterminer l'activité hydrolysante des organes perfusés.

5º- de rechercher s'il était possible, par un traitement prolongé des animaux, d'augmenter l'intensité d'action du ferment étudié (enzyme d'adaptation).

6º- de déterminer jusqu'à quel point la présence des enzymes pouvait perturber le dépistage des intoxications, en d'autres termes de préciser la localisation du médicament à la suite d'intoxications ex-

---

(1)- chlorhydrate de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide cyclopentane -1 - phényl -1- acétique .

(2)- chlorhydrate de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide diphényl-acétique.

périmentales.

7º- d'indiquer quelques-unes des propriétés du catalyseur d'hydrolyse.

Il nous paraissait intéressant du point de vue doctrinal de savoir si l'activité hydrolysante d'un organe pour l'ensemble des substances étudiées était due à un ou plusieurs enzymes, et d'obtenir quelques données sur sa nature.

Au cours de nos travaux, nous avons souvent utilisé, dans un but comparatif, les recherches de nos devanciers sur les estérases citées plus haut.

Nous résumerons donc dans un premier chapitre les principaux travaux effectués pour chacune de celles-ci. Le nombre des publications sur les cholinesterases est trop important pour qu'il puisse en être donné ici même un bref résumé. Nous renvoyons le lecteur aux exposés de LEVY [67-68] , à ceux d'AUGUSTINSSON [6-7] , de HOLMSTEDT [55] et pour les travaux récents, de WILSON et coll. [101 - 102- 103- 104 - 105 - 106] et de KOELLE [60] .

Enfin, il nous a paru utile, avant de rendre compte de nos recherbhes personnelles, d'indiquer quelques-unes des propriétés des médicaments étudiés.

PREMIERE PARTIE

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

TRAVAUX ANTERIEURS

I.- PROCAINESTERASE.-

Recherchant la cause de la fugacité de l'action antagoniste du chlorhydrate de procaïne (1) vis-à-vis de diverses substances toxiques ou médicamenteuses, HAZARD et RAVASSE en 1941 [53] ont mis en évidence le pouvoir hydrolysant du sang à l'égard de ce produit. Pour de simples raisons de commodité, ils dénommèrent procaïnesterase l'enzyme responsable de cette hydrolyse.

HAZARD et BONAMY [42] ont montré que l'activité enzymatique des sérums des animaux était très variable lorsque l'on passait d'une espèce à une autre. Ils pensent même qu'il serait possible " d'ébaucher une analogie entre la classification zoologique des vertébrés et une différenciation basée sur le pouvoir esterifiant du sérum". A noter la faible activité du sérum des Carnivores (Chien - Renard) qui s'oppose à l'intensité de celle du sérum des Rongeurs (Cobaye - Lapin); il faut remarquer également les grandes variations individuelles observées dans une même espèce animale.

---

(1)- Chlorhydrate de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide p. aminobenzoïque.

Au contraire, l'activité procaïnesterasique du sérum de l'Homme normal, bien plus grande que celle des autres espèces, ne varie qu'entre des limites très rapprochées. Mais il n'en est pas de même dans divers états pathologiques, pour lesquels HAZARD et RAVASSE ont trouvé un parallélisme entre l'activité procaïnesterasique du sérum et son pouvoir cholinestérasique. Aussi, s'appuyant sur le fait déjà connu de la déficience de diverses esterases au cours d'insuffisances hépatiques, FIESSINGER, HAZARD et leurs collaborateurs ont-ils fait de l'évaluation de la procaïnesterase sanguine un procédé d'exploration fonctionnelle du foie [28 - 43 - 49 - 50- 51] .

Indépendamment des auteurs français, KISCH, KOSTER et STRAUSS [58 - 59 - 61] ont obtenu des résultats analogues et montré en outre qu'en dehors de la glande hépatique, la thyroïde et les hormones qu'elle secrète paraissent exercer une influence sur l'hydrolyse de la procaïne par le sérum. L'hyperthyroïdie accélère l'hydrolyse de la procaïne. Ce fait a été confirmé par HAZARD et DEROT [46 - 47] .

Dans sa thèse, BONAMY [14] comparant l'action hydrolysante d'un même sérum sur des dérivés voisins de la procaïne (esters de l'acide p. aminobenzoïque) constate que l'hydrolyse se ralentit lorsqu'on alourdit la molécule de l'alcool aminé, ou quand on substitue un alcool simple à un amino-alcool. De plus, cet auteur oppose la labilité du médicament en présence de la procaïnesterase à sa résistance à l'action hydrolysante de la soude.

Citons enfin les travaux de HAZARD et de ses collaborateurs [44 -52] sur les caractéristiques de la procaïnesterase. Ces recherches ont montré que la cholinesterase et la procaïnesterase avaient des inhibiteurs communs (fluorure de sodium, quinine, ésérine, difluorophate); la dihydrone active au contraire l'hydrolyse de la procaïne, comme elle le fait pour la pseudocholinesterase et permet de combattre l'action de certains inhibiteurs. Mais malgré la similitude des résultats obtenus il semble "difficile de conclure à une identité absolue entre procaïnesterase et pseudocholinesterase. Ces recherches permettent cependant

de rapprocher l'une de l'autre ces deux diastases dans le groupe des esterases banales du sérum" [52] .

II.- ASPIRINESTERASE.-

En 1943 VANDELLI et SCALTRITI [98] font paraître un travail établissant le pouvoir hydrolysant du foie et du rein de divers animaux vis-à-vis de l'acide acétylsalicylique. Un peu plus tard VINCENT et LAGREU [99] (1949), étudiant l'action du sérum sur divers substrats, observent que l'aspirine subit une hydrolyse fermentaire considérable.

Le foie du Cobaye paraît être l'organe le plus actif; on trouve également une activité intense dans le rein et le sérum du même animal. Les hématies, le poumon, le pancréas et la rate peuvent hydrolyser des quantités non négligeables d'aspirine, mais beaucoup moins élevées que le foie. DASTUGUE et FAVIER [21] montrent que l'action hydrolysante est retrouvée dans le sérum de différentes espèces ; d'après leur activité sérique les animaux peuvent être classés dans l'ordre décroissant suivant : Cobaye, Vipère, Oie, Pigeon, Lapin, Canard, Rat, Coq, Cheval, Mouton, ordre différent de celui qui est signalé à propos de la procaïnesterase. Il est remarquable que le sérum humain qui possède une très grande activité procaïnesterasique, n'hydrolyse que lentement l'aspirine. Le ferment a été enfin mis en évidence dans l'hémolymphe de Helix pomatia [10] .

GLASSON [33] classe l'enzyme parmi les acétylases et constate le pouvoir hydrolysant du sérum humain aussi bien vis-à-vis d'homologues supérieurs de l'aspirine, tels que l'acide diéthylacétylsalicylique et l'acide diisopropyl-acétylsalicylique qu'à l'égard de substances acétylées voisines, comme certains amides acétylsalicyliques ou aldéhydes acétylsalicyliques. Si la surcharge moléculaire ralentit nettement l'hydrolyse des homologues de l'aspirine, elle n'influe pas, par contre, sur la stabilité relative du groupe acétyl des aldéhydes et des amides; et, pour celle-ci peu importe la place du groupe acétyl, fixé sur l'amide (acétylamide N) ou lié au radical phénolique. BASTIDE et DASTUGUE [10] étudiant eux aussi l'influence de la nature du substrat sur l'activité de l'enzyme, établissant le classement suivant donné dans l'ordre

décroissant : acétylsalicylamide, acide succinyl-disalicylique, aspirine, crésopyrine, acide diéthyl-acétyl-salicylique, diisopropyl-aspirine. S'il paraît difficile de tirer des conclusions pharmacologiques de cette énumération, le travail de ces auteurs a au moins le mérite de signaler que les vitesses d'hydrolyse spontanée se rangent dans le même ordre. Nous verrons qu'il est fréquent de constater un parallélisme entre les vitesses d'hydrolyse obtenues par voie biologique et par voie chimique.

Quelques propriétés de l'enzyme sont mises en relief : pour VINCENT et LAGREU [99] le pH optimum de l'aspirinesterase du foie est compris entre 6,5 et 8 ; GLASSON [33] donne des valeurs différentes : le sérum humain contiendrait un enzyme sur lequel le pH a une influence double, l'une en milieu acide (pH 4 à 5), l'autre en milieu alcalin (pH 7 à 8); l'enzyme des hématies aurait au contraire une activité maximum sur une longue échelle de pH (entre pH 5 et pH 8).

L'ésérine, la quinine, les cyanures, l'acétylcholine, la procaïne, le difluorophate, n'ont aucune action sur l'activité fermentaire. L'atoxyl et le fluorure de sodium sont des inhibiteurs puissants tandis que la dihydrone est un activateur comme dans le cas de la cholinesterase et de la procaïnesterase.

III.- TROPANOL-ESTERASE.-

On sait depuis fort longtemps (1) que certains animaux comme les lapins et les cobayes peuvent se nourrir exclusivement de belladone sans présenter de troubles graves et supportent l'administration de doses considérables d'atropine allant jusqu'à 450 mg en une seule fois, par voie buccale ou hypodermique, avant que cet alcaloïde puisse être retrouvé dans les produits de l'élimination rénale. Mais il suffit d'injecter 2mg dans le cerveau pour faire apparaître les symptômes typiques d'intoxication. HECKEL [54] concluait déjà que " chez les

---

(1)- LEVY et MICHEL [72] attribuent à HECKEL (1875) [54] la primauté de cette observation.

animaux réfractaires aux solanacées vireuses, la quantité d'alcaloïde est détruite dans le torrent circulatoire à mesure qu'elle est absorbée et est éliminée sous un état qu'on ne connaît pas ".

FLEISCHMANN [31] montre ensuite que le sérum des animaux peu sensibles à l'atropine est capable de scinder l'alcaloïde en tropanol et acide tropique. Puis les travaux de METZNER [78] et de LA BARRE [62] tendent à prouver la nature fermentaire de cette hydrolyse.

Mais c'est à LEVY et MICHEL [70 - 71 - 72] et à BERNHEIM et BERNHEIM [12] que l'on doit la preuve de l'existence du ferment appelé tropanolesterase par les premiers cités de ces auteurs.

Si le ferment a été retrouvé dans le foie de nombreux animaux (Lapin, Cobaye, Rat, Souris, Chien, Chat, Grenouille, etc...) le plasma et les reins de Lapin, les reins de Cobaye, le coeur de Grenouille [12 - 26 - 71], il faut remarquer que les animaux d'une même espèce sont très inégalement résistants à l'atropine. Le sérum de certains lapins ne possède aucune activité fermentaire.

BERNHEIM et BERNHEIM [12] ont déterminé la spécificité de l'enzyme. Tous les tissus qui hydrolysent l'atropine, hydrolysent également l'homatropine, la scopolamine, et le mandélate d'éthyle, mais pour ce dernier, sans réciprocité, Les isomères gauches sont détruits préférentiellement. ELLIS [26] constate de plus que les activités des plasmas de lapins à l'égard de l'atropine sont proportionnelles à leurs pouvoirs d'hydrolyse de la benzoylcholine.

Les conditions optimum d'action du ferment diffèrent suivant les auteurs : pour GLICK [35] , le pH optimum se situe entre pH 8,1 et pH 8,4, et la température optimum serait voisine de 38º. Pour LEVY et MICHEL [71] et LEVY [69] l'optimum de température est fixé aux environs de 45º. Il en est de même pour la constante de dissociation dont la valeur donnée par ces auteurs est soit de 6.10^{-5} [35] , soit de $7,8.10^{-4}$ [69] .

L'ésérine a une faible action inhibitrice à l'égard de la tropanolesterase selon LEVY [69] alors que BERNHEIM et BERNHEIM [12]

constatent l'action puissamment inhibitrice de cet alcaloïde. La néostigmine n'influe pas le cours de l'hydrolyse [26] . Les auteurs s'accordent pour reconnaître la grande sensibilité de l'enzyme au fluorure de sodium.

Signalons enfin que la tropanolesterase du sérum (ou du foie) de Lapin est précipitée avec les globulines dans le traitement des protéines par le sulfate d'ammonium comme le sont d'ailleurs, l'acétylcholinesterase, la benzoylcholinesterase, la tropacocaïnesterase et la cocaïnesterase. Cependant, bien qu'aucune méthode n'ait permis de les séparer les unes des autres [26 - 36 - 69] , les différents auteurs font remarquer qu'il s'agit d'esterases distinctes.

IV.- HEROINE-DESACETYLASE.

L'héroïne (ou 3-6 diacétylmorphine) est éliminée chez l'homme par l'urine, en grande partie sous forme de morphine. Ceci implique l'existence dans l'organisme d'un ferment hydrolysant (dit aussi désacétylant).

WRIGHT en 1941 [107] a mis en évidence la présence de cet enzyme dans le sérum de Lapin, puis [108] dans divers tissus de mammifères (Homme, Lapin, Rat); l'organe le plus actif serait le foie suivi en général par le rein, le cerveau, le sérum sanguin et le muscle. Mais ici encore, de grandes variations individuelles ont été constatées.

Ces organes sont susceptibles d'hydrolyser quelques autres dérivés acétylés de la morphine. D'après WRIGHT, il semble que l'on soit en présence de deux ferments : l'un d'eux capable d'hydrolyser les deux fonctions esters de la diacétyl-morphine, l'autre ne pouvant déplacer seulement que l'acétyl phénolique de la diacétyl-morphine ou de la diacétyl-dihydro-morphine et ne désacétylant pas la monoacétyl-dihydromorphine.

Ces fermets sont inactivés par un séjour de 30 minutes à 60°. L'ésérine se comporte à leur égard comme un inhibiteur.

V.- PARPANITESTERASE -

Nous nous bornerons ici à résumer l'essentiel des travaux de PULVER [87] et de DELGA et ANDRIEU [22] puisqu'ils seront fréquemment rappelés dans les chapîtres suivants.

Ces auteurs ont surtout étudié l'hydrolyse du chlorure de caramiphène par les organes du Lapin.

Il a été trouvé de grandes variations individuelles. Pour un même animal, le foie et le rein sont les organes les plus actifs; le sérum est souvent capable d'hydrolyser le chlorure de caramiphène avec une grande vitesse. Mais on trouve des échantillons de sérum à activité très faible ou nulle. Le muscle, le poumon ne possèdent qu'un faible pouvoir hydrolysant. Il est un peu plus élevé dans le cerveau. Parmi les organes du Cobaye et du Rat, PULVER ne retrouve le ferment que dans le foie et le rein.

Après injection de fortes doses de chlorure de caramiphène chez le Lapin, le toxique n'est retrouvé, quand il l'est, que dans le poumon et en plus faible proportion encore dans le cerveau.

La valeur du pH optimum de l'enzyme est de 7,2, la température correspondant à l'optimum d'action est de 50º.

Enfin, si le cyanure de potassium, le fluorure et le sulfure de sodium annihilent l'activité fermentaire, l'ésérine et l'atoxyl ne peuvent être considérés comme des inhibiteurs de cette activité.

o°o

De cet ensemble de recherches, il semble ressortir que les hydrolyses de chacun des substrats sont catalyséespar des enzymes bien distincts les uns des autres (1)

Mais si l'on admet, comme le veulent les théories actuelles, que chaque ferment se trouve déjà en puissance dans l'oeuf fécondé, il paraît difficile de penser qu'il existe déjà dans l'embryon un gène

---

(1)- C'est la conclusion à laquelle aboutissent bien des auteurs et notamment BERNHEIM et BERNHEIM [13] à propos de leur étude sur l'hydrolyse de la péthidine par le foie.

spécial susceptible de se développer en un enzyme capable d'agir spécifiquement sur des composés aussi éloignés que l'héroïne ou l'atropine des autres constituants de l'animal, ou mieux, sur des toxiques synthétiques variant à l'infini, comme l'aspirine, le chlorure de caramiphène, la procaïne, la péthidine, etc...

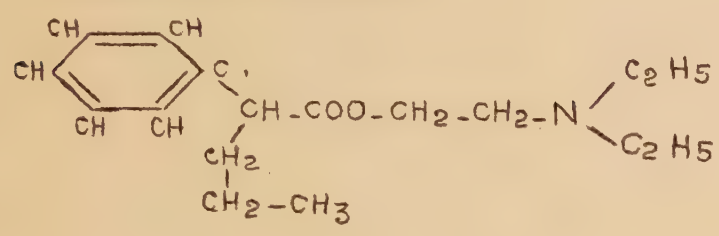
L'étude de l'hydrolyse des esters du diéthylaminoéthanol nous permettra-t-elle de déceler pour chacun l'existence d'un enzyme ?

Avant de l'aborder, nous allons indiquer les principales propriétés des esters utilisés pour ces recherches.

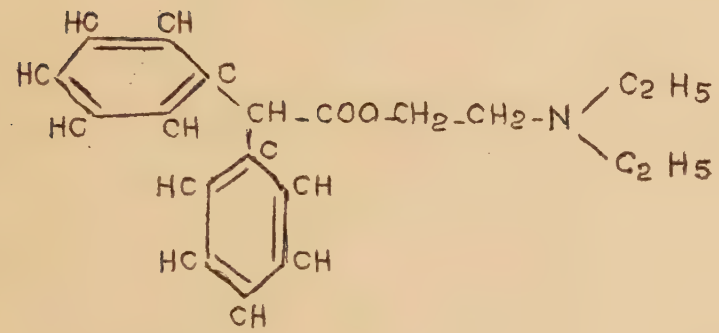
CHAPITRE II

LES MEDICAMENTS ETUDIES (1)

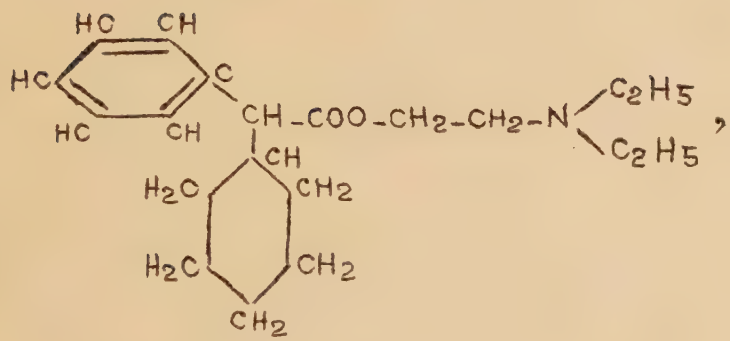
I - CONSTITUTION CHIMIQUE -



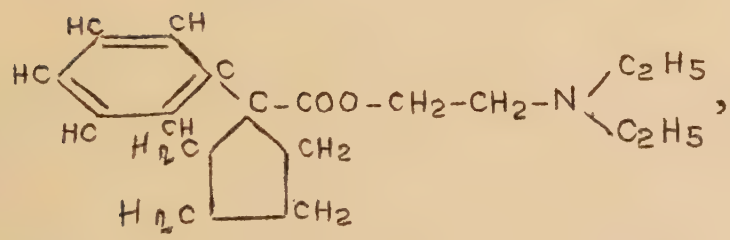
, ClH . Propivane



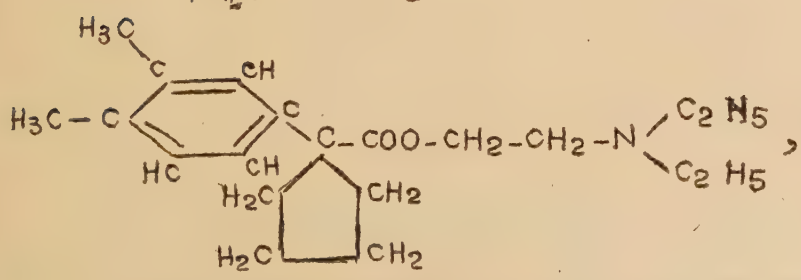
, ClH . Chlorhydrate d'Adiphénine.



, ClH. Chlorhydrate d'Hexahydro-adiphénine.



, ClH. Chlorure de Caramiphène.



, ClH. Chlorure de diméthyl-caramiphène.

---

(1)- Ces produits nous ont été aimablement procurés par les Laboratoires CIBA, GEIGY et SPECIA.

II.- CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES .-

a)- PROPIVANE * - (Spécia).

Chlorhydrate de l'ester propyl-phényl-acétique du diéthylaminoéthanol.

$C_{17}H_{28}O_2NCl$. P.M. : 313,5.
Substance cristalline blanche d'odeur rappelant celle de la rose, de saveur légèrement amère.

Point de fusion : 108º - 109º. Très soluble dans l'eau.

b)- ADIPHENINE (Trasentine* : Ciba)

Chlorhydrate de l'ester diphényl-acétique du diéthylamino-éthanol.

$C_{20}H_{26}O_2NCl$. P.M. : 347,5
Cristaux blancs, inodores, provoquant sur la langue une légère sensation d'anesthésie.
Point de fusion : 112º - 114º . Très solubles dans l'eau.

c)- HEXA-HYDRO-ADIPHENINE (Trasentine H* ou Trasentine 6H* : Ciba)

Chlorhydrate de l'ester phényl-cyclohexylacétique du diéthyl-aminoéthanol.

$C_{20}H_{32}O_2NCl$. P.M. : 353,5.
Petits cristaux blancs, pulvérulents, inodores, anesthésiant légèrement la langue.

Point de fusion : 145º - 147º.
Solubles dans l'eau ; précipitant en milieu très légèrement alcalin (pH 7,2) en fines gouttelettes huileuses.

d)- CHLORURE DE CARAMIPHENE (Parpanit * : Geigy).

Chlorhydrate de l'ester diéthylaminoéthylique de l'acide cyclopentane-1-phényl-1- carboxylique.

$C_{18}H_{28}O_2$ N Cl . P.M. : 325,5 .

Substance cristalline blanche, inodore, de saveur légèrement amère et anesthésiante . Point de fusion : 145º - 146º.

Soluble dans l'eau.

e)- CHLORURE de DIMETHYL 1-2 CARAMIPHENE

Chlorhydrate de l'ester diétylaminoéthylique de l'acide cyclopentane 1-(3-4 diméthylphényl) - 1-carboxylique.

$C_{20}H_{32}O_2$ N Cl . P.M. : 353,5.

Petits cristaux blancs; pulvérulents, inodores, de saveur amère, anesthésiant la langue. Point de fusion : 170º - 171º .

Peu soluble dans l'eau.

Ces différents produits ont une constitution chimique très voisine; ils résultent de l'estérification du même aminoalcool, le diéthylaminoéthanol, par des acides différents, mais de constitution assez similaire. A cette similitude, il peut être attaché une signification thérapeutique générale, comme nous allons le voir.

III.- PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES.-

Du point de vue pharmacologique, ces esters forment un groupe homogène de corps à action antispasmodique, utilisés en clinique comme succédanés de l'atropine et de la papavérine ou comme anti-parkinsoniens.

En effet, comme l'atropine, ce sont des spasmolytiques neurotropes pouvant inhiber l'action de l'acétylcholine sur les fibres lisses, mais ils n'exercent point les effets secondaires déplaisants de cet alcaloïde à action parasympatholytique type, tels que la mydriase ou le tarissement des secrétions.

Comme la papavérine, ils possèdent une action inhibitrice directe sur le muscle lisse et strié, combattant par exemple, l'action du chlorure de baryum sur l'intestin isolé (du Lapin ou du Cobaye), ou

celle du camphre sur le muscle dorsal énervé de la Sangsue (JOACHIMOGLU et KLISSIUNIS [56]).

Mais ces spasmolytiques de synthèse sont beaucoup moins toxiques que la papavérine ou que l'atropine, et si les doses utiles sont parfois plus élevées que celles de l'atropine, le rapport de la dose minimum active à la dose minimum toxique est en leur faveur.

Nous ne chercherons pas à établir un classement des activités de ces produits antispasmodiques, comparées à celles de l'atropine ou de la papavérine, les relations données par plusieurs auteurs étant assez différentes (HALPERN [39], DOMENJOZ [24], TRIPOD [92 - 93], (voir le tableau №1)

Comme la procaïne, enfin, ces esters synthétiques sont doués de propriétés antinicotiniques puissantes, supérieures de deux à trois fois à l'action de celle-ci (HAZARD et coll. [45], TRIPOD [92]). Mais, seuls, l'adiphénine et le chlorure de caramiphène exercent comme la procaïne, une faible action vasodilatatrice périphérique, anesthésique locale.

Leurs applications thérapeutiques sont les suivantes :
Adiphénine et Propivane : sont utilisés dans le traitement des spasmes du tube digestif, des voies biliaires, en pathologie pulmonaire et circulatoire, dans le traitement des troubles de l'appareil uro-génital.

Chlorure de caramiphène : par son influence favorable sur l'hypertonie musculaire, est employé surtout dans les symptômes extrapyramidaux dont la maladie de Parkinson postencéphalitique et la paralysie agitante sont le type.

IV.- TOXICITE.-

Nous donnons dans le tableau № 2 les valeurs des doses léthales moyennes des différents esters spasmolytiques pour le Lapin et le Cobaye ainsi que les doses toxiques correspondantes de l'atropine et de la papavérine. Ici encore il serait peu exact de classer ces esters suivant leur toxicité, puisque les chiffres donnés par plusieurs

auteurs sont souvent divergeants. On remarquera seulement que si les doses injectées par voie veineuse sont très comparables aussi bien pour l'atropine et la papavérine que pour les produits synthétiques, ceux-ci sont généralement beaucoup moins toxiques que ceux-là lorsqu'ils sont administrés par voie hypodermique ou surtout par voie orale.

T A B L E A U № I

ACTION SPASMOLYTIQUE DES ESTERS COMPAREE A CELLE DE L'ATROPINE ET DE LA PAPAVERINE

Doses actives moyennes d'après DOMENJOZ [24] , HALPERN [39] et TRIPOD [91-93] .

	Effet spasmolytique neurotrope (Contracture à l'acétyl-choline) Atropine prise comme unité		Effet myotrope (Contracture au B_aCl_2) Papavérine prise comme unité	
	Intestin Lapin	Intestin Cobaye	Intestin Lapin	Intestin Cobaye
Atropine	1	1	-	20 à 25
Papavérine	-	-	1	1
Propivane	56	2 à 3	0.75	0,75 à 1
Adiphénine	5 et 18	3 à 4	0,3	0,8 à 1
Hexahydroadiphénine	7	-		
Chre de caramiphène	13 et 10		0,3	
Chre de diméthycaramiphène	4		0,4	

TABLEAU Nº 2

DOSES LETHALES MOYENNES (mg/kg) des SPASMOLYTIQUES COMPAREES A CELLES DE L'ATROPINE ET DE LA PAPAVERINE.

	V. hypodermique	V. veineuse	V. orale
I. Souris			
Atropine	925 (5), 600 (2)	65 (1 & 2), 95 (5)	75 (2)
Papavérine	175 (2)	25 (2), 30 (1)	
Propivane	1.550 (2)	55 (2)	650 (2)
Adiphénine	600 (5), 1.375 (2)	37 (2), 40 (1), 48 (5)	550 (2)
Hexahydroadiphénine	1.100 (5), 2.000 (4)	40 (4&5)	2.000 (4)
Chre de caramiphène	360 (5)	67,5 (1)	
Chre de diméthyl-caramiphène		44 (6)	
II. Lapin			
Atropine	525 (2)	50 (1&2)	600 (2)
Papavérine		25-30 (1&2)	
Propivane	1.400 (2)	20 (2)	1.500 (2)
Adiphénine	350 (3)	20 (1&2), 30 (3)	2.225 (3)
Hexahydroadiphénine	600 (4)	25 (4)	2.000 (4)
Chre de caramiphène		12 (1)	
Chre de diméthyl-caramiphène		19 (6)	

(1) selon DOMENJOZ [24] .
(2) selon HALPERN [40] .
(3) selon MEIER [76] .
(4) selon MEIER et HOFFMANN [77] .
(5) selon TRIPOD [93 - 94] .
(6) documentation GEIGY.

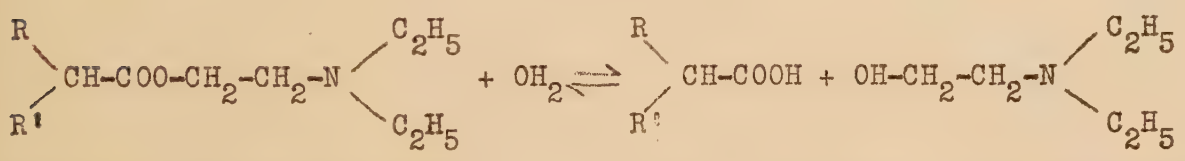
DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES UTILISEES

CHAPITRE I

METHODES de DOSAGE

Les substances étudiées résultent, nous l'avons vu, de l'estérification du diéthylaminoéthanol par différents acides; par hydrolyse, elles redonnent l'acide et l'alcool aminé qui les constituent :



Ester du diéthylaminoéthanol Acide esterifiant + diéthylaminoéthanol

R et R' représentant des groupements hydrocarbonés, aliphatiques, cyclaniques ou aryliques.

Pour étudier l'hydrolyse de ces esters, il faut pouvoir, soit mesurer l'excès de l'ester en présence de ses produits d'hydrolyse, soit, au contraire, doser l'un des produits de l'hydrolyse en présence de l'ester correspondant.

En outre, il importe que les techniques de dosage satisfassent à certaines conditions :

- présenter une sensibilité telle qu'il soit possible d'évaluer les petites quantités de produits mises en oeuvre dans les milieux

biologiques,

- être facilement applicables au dosage des substances étudiées dans ces milieux biologiques.

Enfin, il est, dans certains cas, nécessaire d'effectuer rapidement un grand nombre de dosages et parfois d'enregistrer presque sans discontinuité l'évolution de l'hydrolyse.

Nous avons utilisé, suivant les circonstances, deux méthodes :

I - Une méthode colorimétrique permettant de doser les esters du diéthylaminoéthanol,

II - Une méthode manométrique permettant de doser l'acide libéré au cours de l'hydrolyse.

METHODE COLORIMETRIQUE

Dosage des Chlorhydrates de quelques Esters du Diéthylaminoéthanol

I - Considérations générales.

Les cinq esters du diéthylaminoéthanol donnent les réactions des alcaloïdes, mais les techniques classiques d'extraction et de dosage de cette classe de corps ne répondent pas aux exigences que nous avons énumérées.

Depuis une quinzaine d'années, plusieurs auteurs ont décrit des méthodes colorimétriques de dosage, basées sur la combinaison de nombreux alcaloïdes et bases organiques avec certains colorants acides, combinaison dont la solubilité est beaucoup plus grande dans les solvants organiques que dans l'eau. En 1940, PRUDHOMME [86] a préconisé le dosage de solutions de quinine par la formation d'un complexe avec l'éosine, soluble dans le chloroforme. Des réactions analogues ont été signalées peu après : utilisation du bleu de bromothymol pour le dosage de la péthidine par LEHMAN et AITKEN [63] , emploi du bleu de bromophenol par AUERBACH [5] pour doser les ammoniums quaternaires, du pourpre de bromocrésol par DURICK et Coll. [25] pour les alcaloïdes tro-

piques, BRODIE et UDENFRIEND [16] ont montré en 1945 le caractère général de ces réactions vis-à-vis de nombreuses bases organiques azotées et préconisèrent l'emploi du méthylorange ou hélianthine soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme et dans le dichloréthane.

De nombreux auteurs ont appliqué, depuis, la technique de BRODIE et UDENFRIEND au dosage de composés organiques basiques dans les liquides biologiques : BRODIE, UDENFRIEND et DILL [17] , DILL et GLAZKO [23] , HALEY et BASSIN [38] , BRODIE, ARONOW et AXELROD [15] , FISHER et LONG [29], KELLER et ELLENBOGEN [57] , etc...

Elle a été également employée par DELGA et ANDRIEU [22] ainsi que par PULVER [87] au cours de leurs études sur le chlorure de caramiphène.

C'est de la méthode de BRODIE, UDENFRIEND et DILL [17] que dérive la technique que nous avons utilisée au cours de ce travail.

II - Principe de la réaction :

Les esters étudiés extraits par le dichloréthane d'un milieu aqueux convenablement tamponné, se combinent avec le méthylorange en formant un complexe jaune, soluble dans le dichloréthane, alors que le méthylorange est insoluble dans ce solvant. Par acidification du milieu, le complexe est détruit et le colorant, rouge, est libéré. De l'intensité de la coloration obtenue, on peut déduire la quantité de colorant combiné et par suite la quantité d'ester du diéthylaminoéthanol mise en oeuvre.

III - Technique .

1 - Réactifs nécessaires -

a)- Solution tampon phosphatée de Sörensen à pH 6 :

Solution de phosphate monopotassique M/15 : 87,5 ml

Solution de phosphate disodique M/15 : 12,5 ml

b)- Dichloro 1-2 éthane : produit du commerce purifié par lavage avec de la soude 10 N, puis avec de l'acide chlorhydrique N et finalement trois fois avec de l'eau distillée.

c)- Solution de méthylorange : Agiter une solution d'acide borique M/2 avec un excès de méthylorange. filtrer, agiter trois fois avec du dichloréthane et conserver sur une couche de dichloréthane dans une fiole colorée et bouchée émeri. Il est préférable de préparer cette solution deux à trois semaines avant son emploi; en effet, pendant ce temps, les fines particules de méthylorange qui ont pu passer à travers le filtre, se rassemblent à l'interface dichloréthane - solution aqueuse, ce qui permet d'obtenir une solution de méthylorange de concentration constante.

d)- Solution d'acide borique M/2.

e)- Solution à 2 p.100 d'acide sulfurique concentré (D=I,84) dans l'alcool à 95º.

f)- Solution à I p.100 d'acide tartrique dans l'alcool à 95º.

2 - Dosage proprement dit.

Introduire 1 ou 2 ml de la solution aqueuse à doser contenant, sous forme de sel, 5 µg à 100 µg de base azotée dans un tube à centrifuger de 40 ml à goulot étroit.(1) Ajouter 20 ml de solution de phosphate tampon à pH 6, puis 10 ml de dichloréthane et agiter énergiquement pendant 30 secondes. Après centrifugation, éliminer la couche aqueuse surnageante par siphonnage au moyen d'une pipette effilée reliée à une trompe à vide par l'intermédiaire d'un flacon. Filtrer le solvant organique pour en parfaire la séparation et recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger de 15 ml; y ajouter 0,5 ml de la solution de méthylorange et agiter vivement pendant 30 secondes, en interposant entre l'orifice du tube et le doigt un petit carré de cellophane lavé. Centrifuger à nouveau et siphonner comme précédemment la couche supérieure contenant l'excès de colorant. Laver deux fois, par agitation (10 secondes) avec 1 ml de solution d'acide borique, le dichloréthane plus ou

---

(1)- Il est indispensable que la verrerie utilisée soit d'une propreté rigoureuse. Avant, chaque dosage elle a toujours été nettoyée par séjour de 10 minutes dans un mélange sulfochromique bouillant, puis lavage à l'eau, à l'eau distillée et séchage à l'étuve.

moins coloré en jaune suivant la quantité de composé à titrer. Siphonner chaque fois très soigneusement la couche aqueuse surnageante après centrifugation (1).

Prélever alors 5 ml de dichloréthane coloré et l'acidifier par 1 ml d'alcool sulfurique. La coloration du liquide vire au rouge.

Mesurer son intensité au moyen d'un électrophotomètre, en utilisant un écran vert nº 520 (2).

L'établissement d'une gamme étalon effectuée à partir d'une solution pure de produit permet de déterminer la quantité de ce produit contenue dans la prise d'essai. (Au cours de nos recherches, l'étalonnage a été fréquemment vérifié. Les rares variations constatées, toujours très faibles, ont généralement coïncidé avec l'utilisation d'une nouvelle solution de méthylorange).

Cette technique permet de doser de 5 µg à 100 µg des produits expérimentés avec des écarts maximum de ± 2 µg pour des concentrations en base organique de 5 à 50 µg par ml et ne dépassant pas ± 3 µg pour des concentrations voisines de 100 µg par ml .

Les courbes d'étalonnage correspondant aux cinq chlorhydrates des esters du diéthylaminoéthanol étudiés sont représentées dans le graphique nº I .

3 - Application aux dosages en milieux biologiques .

La déprotéinisation des milieux biologiques est nécessaire avant l'application de la technique qui vient d'être décrite. En effet, elle assure une bonne mise en solution du produit et permet d'obtenir des séparations nettes entre les différentes phases liquides au cours du dosage. Cette opération a en outre l'avantage de stopper rapidement toute activité enzymatique.

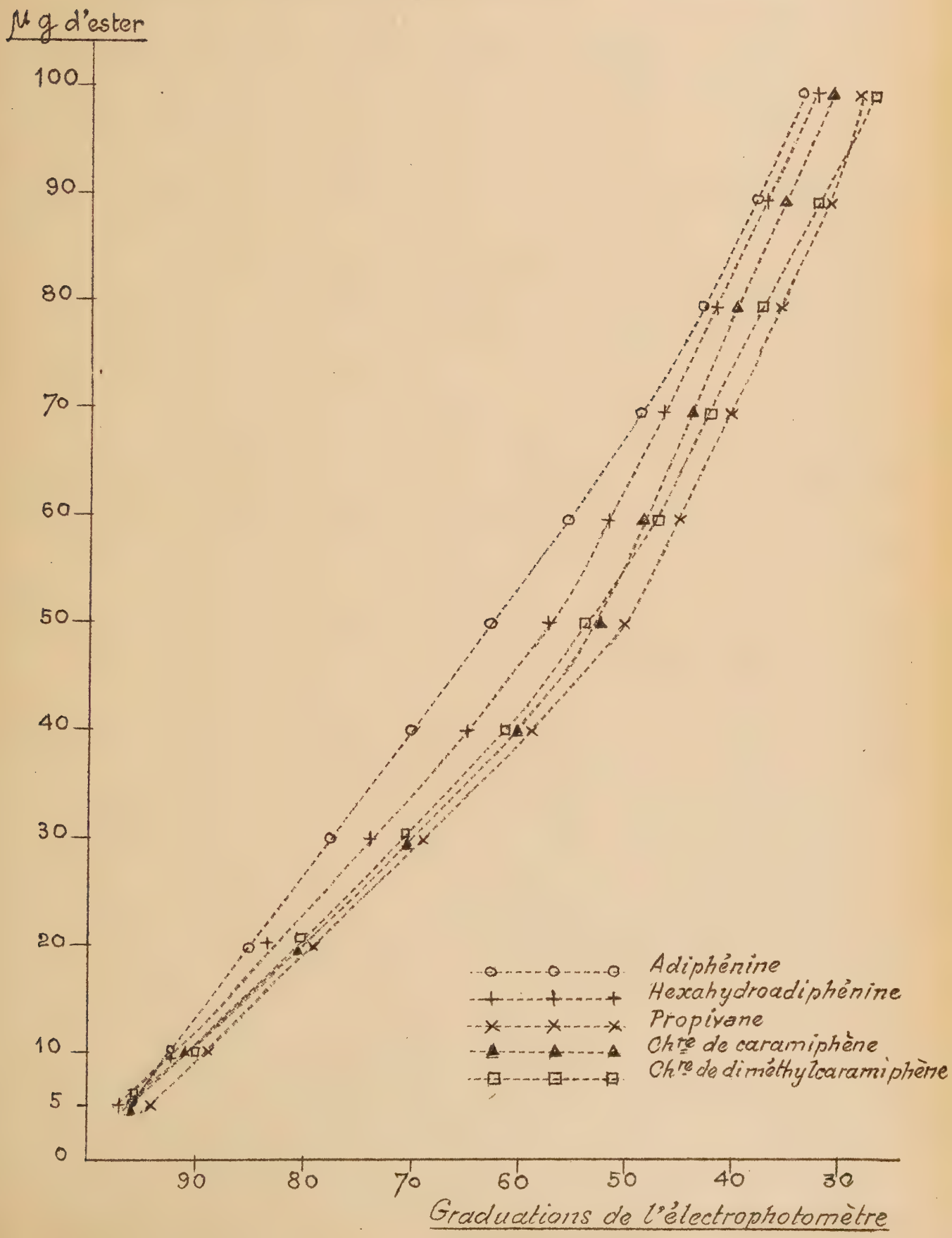
---

(1)- Il importe de respecter ces conditions pour obtenir des résultats reproductibles.

(2)- Pour nos recherches nous avons utilisé l'électrophotomètre de Rouy (Ets SAGEM).

FIGURE I

DOSAGE COLORIMETRIQUE DES ESTERS DU DIETHYLAMINOETHANOL



Nous avons adopté le mode opératoire suivant :

Mélanger 1 ml de liquide biologique (ou 1 g de broyat d'organe) à 9 ml d'alcool tartrique à 1 p. 100.

Laisser en contact au moins dix minutes. Centrifuger. Prélever 1 ml de liquide surnageant et procéder au dosage comme il est indiqué ci-dessus.

Le volume d'alcool tartrique prélevé en vue du dosage ne doit pas dépasser 1 ml. En effet, pour obtenir une extraction totale des bases organiques par le dichloréthane, il est indispensable que la teneur en alcool de la phase aqueuse soit inférieure à 5 p.100.

L'application de cette technique aux dosages de quantités d'esters du diéthylaminoéthanol comprises entre 5 et 100 μg, introduites dans divers milieux biologiques dépourvus de pouvoir hydrolysant, nous a montré que l'erreur ne dépassait pas, ici encore, $\pm$ 3 μg .

o°o

Cette méthode présente de gros avantages :

1º- Elle ne nécessite l'emploi d'aucun appareil coûteux.

2º- Elle s'applique, avec une égale sensibilité, au dosage des cinq esters du diéthylaminoéthanol que nous avons étudiés et permet ainsi de rechercher et doser ces médicaments dans les organes d'animaux intoxiqués. Son manque de spécificité ne pouvait nous gêner dans la réalisation de notre travail. Nous n'avons jamais eu à opérer sur un milieu contenant plus d'un de ces esters et nous avons vérifié que les divers milieux biologiques utilisés ne contenaient pas de substances interférant.

3º- Enfin, elle a sur la méthode manométrique l'avantage de ne pas obliger à l'utilisation de milieux réactionnels bien définis (solution de bicarbonate).

Par contre, elle est moins expéditive que celle-ci et c'est pourquoi nous la lui avons préférée pour les études cinétiques qui demandent de très nombreuses déterminations.

METHODE MANOMETRIQUE

Application à la détermination de l'hydrolyse enzymatique de l'adiphénine

Cette seconde méthode permet d'évaluer indirectement la quantité d'acide formé au cours de l'hydrolyse.

Les méthodes manométriques sont très généralement utilisées en enzymologie; elles sont, en effet, applicables à tout système enzymatique qui catalyse une réaction entraînant, directement ou indirectement, la production ou l'absorption d'un gaz.

Nous avons utilisé pour nos déterminations la méthode et l'appareil de Warburg, en suivant les modalités d'application données par AMMON [1] et NACHMANSON [73bis et 80] pour la mesure de l'activité cholinesterasique des tissus (I).

I - Principe de la réaction

L'hydrolyse de l'adiphénine produit de l'acide diphénylacétique. Cette production d'acide diphénylacétique est suivie manométriquement au moyen de la libération d'anhydride carbonique à partir d'une solution tampon bicarbonatée.

II - Réactifs nécessaires

a)- Solution de Krebs-Ringer bicarbonatée préparée par mélange des solutions suivantes :

(1)-	Solution de	NaCl	à 9%	(0,154 M)	:	100 parties
(2)-	"	KCl	à 1,15%	(0,154 M)	:	4 "
(3)-	"	$CaCl_2$	à 1,22%	(0,110 M)	:	3 "
(4)-	"	KH_2PO_4	à 2,11%	(0,154 M)	:	I "
(5)-	"	$MgSO_4,7H_2O$	à 3,82%	(0,154 M)	:	I "
(6)-	"	$NaHCO_3$	à 1,30%	(0,154 M)	:	2I " (saturée de gaz carbonique pendant 1 heure)

(1)- Les détails techniques sur l'utilisation de l'appareil de WARBURG ont été pris dans l'ouvrage de UMBREIT (96).

Faire passer dans cette solution, pendant dix minutes, un courant gazeux à 95% d'azote et 5% de gaz carbonique, et garder au froid dans un flacon bouché émeri jusqu'au moment de l'emploi.
La solution de Krebs-Ringer bicarbonatée doit être renouvelée chaque jour. Pour simplifier les préparations, il est pratique de disposer d'un mélange des solutions (I) à (5) (conservation une semaine) avec lequel 16 ml de la solution (6) sont diluées à 100 ml . Le pH de cette solution est voisin de 7,80.

b)- Un mélange gazeux sous pression contenant 95% d'azote et 5% de gaz carbonique.

III - Technique

Introduire dans l'espace annulaire de la fiole de Warburg 0,I à I ml de solution ou suspension enzymatique et amener à un volume de 2 ml par addition de tampon bicarbonaté. Introduire ensuite dans le diverticule latéral 0,5 ml d'une solution d'adiphénine dans ce même tampon (Les concentrations des solutions d'adiphénine utilisées étaient généralement de 2,5 p.1000; le volume total de liquide dans la fiole de Warburg étant de 2,5 ml, les concentrations finales de substrat étaient donc de 0,5 p.1000, soit 0,00143 M).

Relier les manomètres aux fioles; placer celles-ci dans le bain-marie à 37º et y faire passer le mélange gazeux à 95% d'azote et 5% de gaz carbonique pendant cinq minutes, après avoir mis en marche le système d'agitation de l'appareil, Laisser l'équilibre s'établir à 37º pendant 10 minutes.

Enfin mélanger les solutions d'enzyme et de substrat et procéder aux lectures en laissant 10 secondes d'intervalle entre la lecture de chaque manomètre. La quantité de gaz carbonique dégagée est calculée en multipliant la variation de pression observée par la constante de l'appareil.

La libération de gaz carbonique par action de l'acide diphénylacétique sur le tampon bicarbonaté, est une réaction stoechiométrique. Nous avons pu le vérifier en comparant avec les valeurs théoriques les

volumes effectivement dégagés par des quantités d'acide diphénylacétique de l'ordre du mg .

Les résultats consignés dans le tableau suivant montrent que l'erreur ne dépasse par 5 p. 100.

TABLEAU Nº 3

VOLUME DE GAZ CARBONIQUE DEGAGE SOUS L'ACTION DE QUANTITES CONNUES D'ACIDE DIPHENYLACETIQUE

Acide diphénylacétique en mg	Adiphénine correspondante en mg	CO_2 dégagé en µl	CO_2 valeur théorique en µl	Erreur p. 100
0,75	1,24	75	78	3,9
1,07	1,76	106	111	4,5
1,18	1,93	122	122	0
0,91	1,49	93	96	3,2

L'acide diphénylacétique, insoluble dans l'eau, a été pesé directement dans le flacon au moyen d'une semi-microbalance.

Cependant, les déterminations d'activités enzymatiques peuvent être entachées d'erreurs systématiques, soit par l'action perturbatrice des divers milieux biologiques, soit par l'hydrolyse spontanée de l'adiphénine. Cette observation prend toute sa valeur si l'on se rapporte, comme nous l'avons fait, à de faibles dégagements gazeux, inférieurs le plus souvent à 50 µl.

Pour éviter ces erreurs, il est donc nécessaire de contrôler pendant chaque dosage le comportement de fioles témoins, contenant, l'une la préparation enzymatique sans substrat, et l'autre la seule solution d'adiphénine dans le tampon.

o°o

Les traits caractéristiques de la méthode manométrique sont :

- la facilité avec laquelle on peut étudier les cinétiques des réactions enzymatiques sous diverses influences : action de la concentration en enzyme, en substrat, action des inhibiteurs,
- la rapidité des déterminations,
- la possibilité de n'utiliser que de faibles quantités de préparation enzymatique.

C'est pourquoi nous l'avons appliquée à l'étude de l'hydrolyse de l'adiphénine, substrat que nous avons choisi comme type. Nous avons vérifié que cette technique serait également applicable à l'étude de l'hydrolyse du chlorure de caramiphène et du propivane. Mais, pour des causes que nous n'avons pu élucider, nous avons constaté qu'elle ne serait pas transposable à l'étude de l'hydrolyse de l'hexahydroadiphénine.

Un point important est à signaler : les volumes de gaz carbonique mesurés au cours de l'hydrolyse d'une quantité déterminée d'adiphénine ne dépassent pas 80% des valeurs théoriques calculées sur la teneur en adiphénine du milieu ; il est vraisemblable que l'hydrolyse spontanée de ce substrat pendant les opérations préliminaires du dosage, soit en grande partie responsable de ce fait.

Notons enfin que si cette méthode permet de comparer aisément les différentes activités des préparations enzymatiques, il semble difficile de donner une correspondance entre les résultats obtenus manométriquement et ceux que fournissent la technique colorimétrique. On sait qu'il en est de même pour la mesure de l'activité cholinesterasique.

CHAPITRE II

PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Au cours de notre travail, nous avons étudié l'hydrolyse des esters énumérés plus haut, soit par des tissus liquides (sang total ou défibriné, sérum, plasma), soit par des suspensions d'organes frais, soit enfin par des préparations enzymatiques stables (poudres acétoniques de foies de cobayes).

Nous décrivons dans ce chapître le mode d'obtention de ces sources d'enzymes.

I.- TISSUS LIQUIDES.

Le sang est recueilli soit par ponction cardiaque, soit par saignée de l'animal à la carotide. Il est reçu dans un tube à centrifuger et le sérum est séparé par centrifugation après rétraction du caillot.

Le plasma est préparé à partir du sang récolté sur une solution aqueuse de citrate trisodique : $C_6 H_5 O_7 Na_3$, 2 H_2O à 25 g p. 1.000 à raison de 20 ml pour 100 ml de sang et centrifugé le plus rapidement possible après le prélèvement.

Le sang défibriné, enfin est obtenu par agitation du sang frais avec des perles de verre et passage sur mousseline.

II.- PREPARATION D'UNE SUSPENSION D'ORGANE FRAIS.

Aussitôt après la mort de l'animal, sacrifié par saignée, l'organe est prélevé puis découpé avec des ciseaux jusqu'à fine division. Un à deux grammes de cette purée sont homogénéisés pendant deux à trois minutes dans un broyeur de POTTER et ELVEHJEM [85] avec un volume de solution tampon tel, que le titre de la suspension obtenue soit de 0,20 ou 0,25 gramme d'organe par ml . L'homogénéisation doit

se faire sans échauffement en prenant les précautions suivantes :

1º- le tampon utilisé (tampon de Sörensen à pH 7,2 ou solution de Ringer bicarbonatée) est préalablement refroidi à 0º

2º- On fait plonger, pendant quelques minutes avant son utilisation, le piston de l'appareil de POTTER dans un mélange réfrigérant (glace - sel) après avoir rempli la cavité interne de ce piston d'une solution d'alcool à 60º.

3º- enfin le tube de POTTER plonge pendant toute la durée de l'opération dans un erlenmeyer contenant de la glace pilée.

Grâce à ces précautions, la température de la suspension ne dépasse pas +4º à la fin de l'homogénéisation; elle est gardée à une temrature voisine de +4º jusqu'au moment de son utilisation.

Notons que nous n'avons jamais constaté de diminution d'activité enzymatique après congélation d'un organe aux environs de -10º, pendant des temps qui ne dépassaient pas, il est vrai, quelques heures. Ceci permet de préparer dans de bonnes conditions des suspensions de différents organes d'un même animal.

III- OBTENTION D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE STABLE .

Nous verrons que l'activité enzymatique de certains organes (le foie par exemple) ne nécessite pour chaque essai que l'utilisation de faibles quantités de tissus. Il est donc possible de réaliser un grand nombre d'essais à partir d'un de ces organes et d'avoir ainsi à sa disposition une source d'enzyme d'activité constante. Mais ceci exige la "stabilisation des tissus".

La meilleure source d'enzyme pour obtenir de telles prépararations, nous a paru être le foie de Cobaye. Sa stabilisation est obtenue par immersion d'une purée fraîche d'organe dans de l'acétone, ce qui a l'avantage de délipider et de déshydrater la préparation sans détruire l'esterase.

Le mode opératoire utilisé est le suivant :

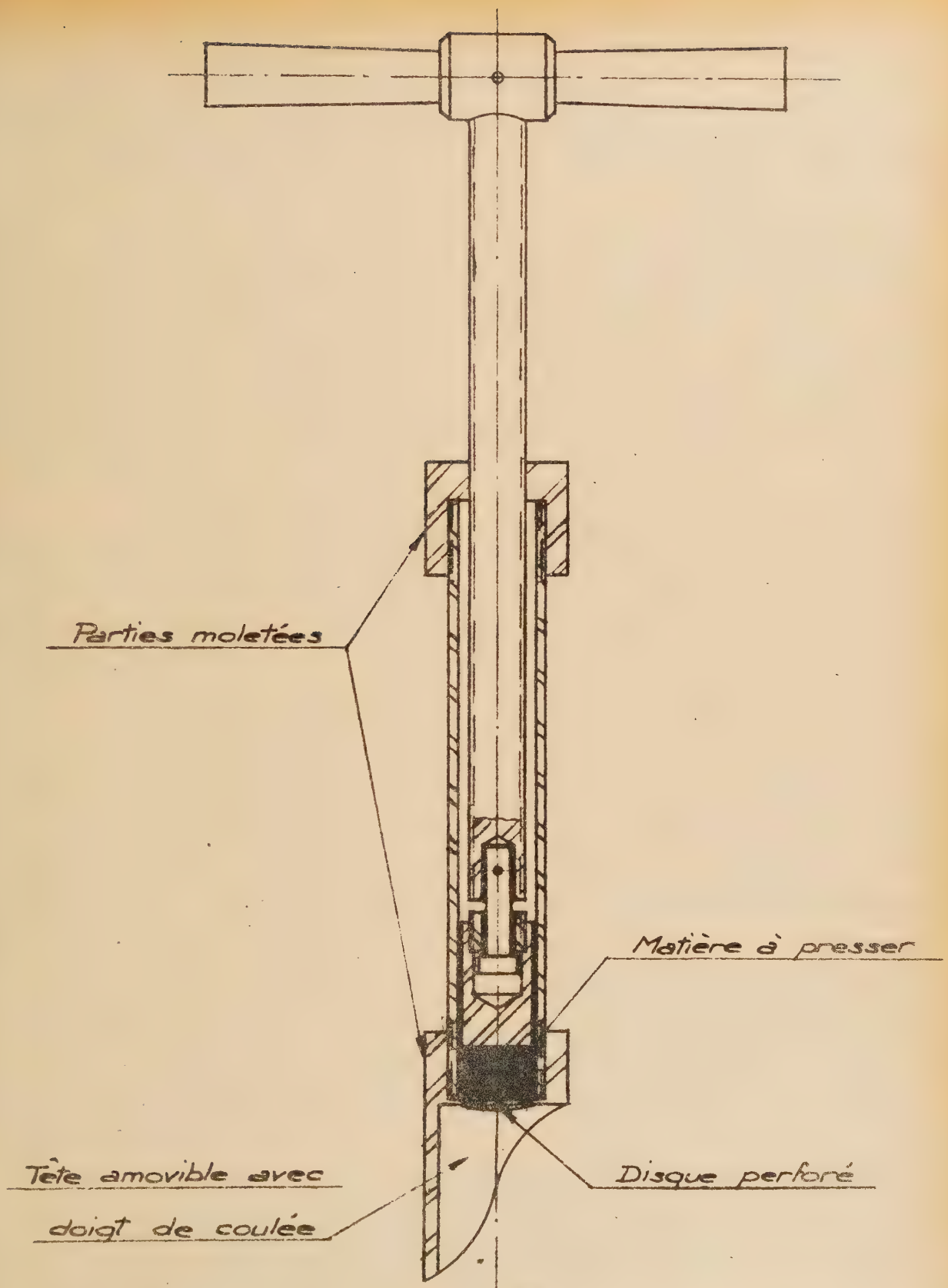


Schéma du pulpeur utilisé

Echelle : 1 Matière : Aluminium

DJ

Les foies de plusieurs cobayes sont recueillis dès la mort des animaux, placés quelques instants au réfrigérateur, puis incisés grossièrement avant d'être pulpés dans un petit broyeur dont la description suit :

Cet appareil est constitué d'un cylindre creux de 18 mm de diamètre intérieur, de 104 mm de longueur et dont les extrémités sont filetées. Sur l'une d'elles vient s'adapter un petit couvercle au milieu duquel peut se visser la tige d'un piston ayant sensiblement le même diamètre que le cylindre. A l'autre extrémité peuvent s'adapter des disques perforés d'ouvertures plus ou moins grandes contre lesquels le piston vient buter.

L'appareil est refroidi à -5º avant son utilisation et les morceaux d'organe, introduits dans le cylindre, sont compressés par le piston que l'opérateur enfonce doucement en faisant tourner la poignée, et ainsi, exprimés par les fins orifices du disque en une purée très homogène.

50 g de purée d'organe sont agités cinq minutes avec 250 g d'acétone refroidie aux environs de +4º (1). On essore le mélange sous vide dans un Büchner dont le fond est garni d'une toile serrée. On obtient un gâteau brun friable que l'on remet en suspension dans le même volume d'acétone et laisse en contact cinq minutes. On essore à nouveau sur Büchner. Le gâteau est effrité sur du papier filtre puis mis pendant deux heures sous une cloche à vide.

A la fin de ces opérations, on obtient une poudre granuleuse bistre dépourvue de toute odeur d'acétone. Le rendement est voisin de 25 %. La poudre est pulvérisée au mortier, et moins de 24 h. après, répartie par fractions de 0,20 g dans les flacons scellés sous atmosphère d'azote (2).

---

(1)- L'utilisation d'acétone refroidie à plus basse température n'est pas indispensable; bien au contraire, des essais préalables nous ont montré que l'acétone à -10º entraîne par congélation la formation de petits agglomérats de purée qu'il est ensuite très difficile de déshydrater complètement.

(2)- Nous remercions Monsieur SCHINDS, Pharmacien, Chef de Service du Laboratoire CHOAY, à qui nous devons le conditionnement de cette préparation.

Nous avons vérifié que le traitement acétonique ne diminue pas le pouvoir estérasique des tissus : c'est ainsi que 50 mg de cette préparation ont sensiblement la même activité enzymatique que 200 mg d'organe frais. Le rapport de ces deux nombres est celui du rendement de la préparation. Cette poudre a été conservée pendant plus de six mois à la glacière et nous n'avons pas constaté de diminution de son activité.

Au moment de son utilisation la poudre de foie est mise en suspension par broyage au mortier dans 10 fois (généralement) son poids de solution tampon. On laisse en contact 20 à 30 minutes avant l'emploi.

Ces poudres stables de foies de cobayes nous ont permis d'étudier les propriétés de l'enzyme.

T R O I S I E M E P A R T I E

HYDROLYSE ENZYMATIQUE IN VITRO DES SPASMOLYTIQUES

LOCALISATION de l'ACTIVITE

Dans cette partie, nous étudierons tout d'abord l'hydrolyse de l'adiphénine par les principaux organes ou tissus des espèces animales les plus communément utilisées au laboratoire, puis nous comparerons les destructions des spasmolytiques choisis, aussi bien par hydrolyse enzymatique que par hydrolyse chimique. Un chapître à part sera consacré à l'étude de l'activité des sérums et spécialement à celle du sérum humain. Enfin, il sera fait une comparaison des pouvoirs esterasiques de tissus d'animaux sains et de ceux d'animaux traités pendant plusieurs mois par l'un des spasmolytiques.

Cet ensemble de travaux nous permettra :

1º- de connaître la répartition de l'enzyme en fonction de l'organe et de l'espèce et par là, de déceler le lieu où se fait la détoxication.

2º- de déterminer l'influence de la constitution chimique de l'ester sur le degré d'hydrolyse et de juger déjà de la spécificité de l'esterase.

3º- de localiser dans le sérum la nature du groupe de protéïnes auquel appartient l'enzyme étudié.

4º- de rechercher la formation éventuelle d'enzyme d'adaptation qui nous permettrait d'expliquer les phénomènes d'accoutumance.

CHAPITRE I

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR QUELQUES TISSUS D'ESPECES ANIMALES DIFFERENTES

Les espèces utilisées ont été le Cobaye, le Rat, le Lapin, et le Chien. Nous avons opéré sur des homogénats d'organes frais tels que le foie, le rein, le coeur, le poumon, le cerveau et suivant les circonstances, le sangdéfibriné ou le sérum. Les mesures des activités enzymatiques de ces tissus, vis-à-vis de l'adiphénine, ont été réalisées en suivant la technique manométrique que nous rappelons brièvement en précisant certains points :

a)- dans l'espace annulaire de la fiole de Warburg sont introduits : 1 ml de suspension d'organe titrant 0,20 g/ml d'organe frais, ou bien 0,5 ml de sang défibriné ou de sérum; on complète à 2 ml avec du Ringer bicarbonaté.

b)- dans le diverticule latéral : 0,5 ml de solution d'adiphénine à 2,5 p. 1.000 dans la solution de Ringer bicarbonatée.

Le volume total de liquide dans la fiole de Warburg est ainsi de 2,5 ml et finalement, les concentrations des divers constituants après mélange sont les suivantes :

- concentration en adiphénine	:	0,5 g	p. 1.000
- concentration en organe frais	:	80 g	p. 1.000
- concentration en sérum	:	200 ml	p. 1.000

Ces nombres ont été choisis en tenant compte des résultats obtenus lors de l'étude des propriétés de l'enzyme (voir chapitre I, IVème Partie).

Résultats : Condensés dans les tableaux № 4, 5, 6, 7, 8 ; ils appellent les commentaires suivants :

I - Cobaye : Des six tissus examinés, le foie est de beaucoup le plus riche en esterase et ce, de façon sensiblement constante. Le rein bien que présentant une activité hydrolysante moins grande, est toujours un organe ayant une teneur en esterase élevée, de façon constante également.

Le sang et le poumon détruisent l'adiphénine à des vitesses non négligeables, mais les résultats trouvés pour ces derniers sont assez variables d'un sujet à l'autre.

Par contre le coeur et le cerveau n'hydrolysent que faiblement ou pas du tout l'adiphénine.

II - Rat : Chez le Rat, le foie et le sérum se sont seuls révélés capables d'hydrolyser l'adiphénine, mais la richesse de ces organes en enzyme est très variable. En effet deux seulement des cinq foies expérimentés ont des activités comparables à cellesdes foies de cobayes et les activités des différents sérums de rats sont, de toute façon, très inférieures à celles que nous avons trouvées pour les sérums de cobayes.

Signalons ici la seule exception que nous ayons rencontrée au cours de cette prospection : le foie du Rat № III est totalement inactif vis-à-vis de l'adiphénine, alors que le sérum de cet animal est capable d'en activer l'hydrolyse, en faible proportion il est vrai.

III - Lapin : DELGA et ANDRIEU [22] et PULVER [87] , étudiant la destruction enzymatique du chlorure de caramiphène, ont choisi le Lapin pour leur expérimentation. Les résultats obtenus par les premiers auteurs montrent qu'il existe d'assez grandes variations de l'activité esterasique d'un même organe lorsqu'on passe d'un animal à l'autre. Le foie et le sérum sont en général très riches en enzymes. Mais au cours de recherches portant sur une cinquantaine d'animaux, PULVER a montré qu'environ 50 p. 100 seulement de ceux-ci possédaient un sérum hydrolysant rapidement le chlorure de caramiphène, celui des autres n'avait qu'une activité enzymatique très faible ou nulle.

Il était intéressant de comparer les conclusions de ces auteurs avec celles que devait fournir l'étude de l'hydrolyse de l'adphénine par les différents organes des mêmes animaux et de rechercher plus particulièrement des sérums de Lapin actifs vis-à-vis de cet ester.

En effet le Lapin peut fournir de grandes quantités de sérum et cette source possible d'enzyme est d'une utilisation très commode.

Tableaux № 6 et № 7 :

a)- Lapins domestiques : parmi les animaux de l'élevage du laboratoire, il n'en a été trouvé qu'un seul dont le sérum ait un pouvoir enzymatique notable vis-à-vis de l'adiphénine : (domestique № 2). Cependant l'examen des organes d'un lapin à sérum totalement inactif (domestique № I) montre que le foie, puis par ordre décroissant, le rein et les poumons de cet animal sont capables de détruire l'ester.

b)- Lapins de garenne ; devant ces résultats nous avons poursuivi notre expérimentation sur des lapins de garenne; chez ceux-ci, six sur sept des sérums examinés sont, bien qu'avec quelques différences, très riches en esterase, mais l'activité enzymatique se localise de la même façon que chez le Lapin domestique et c'est encore le foie qui hydrolyse le plus rapidement l'adiphénine, suivi du sérum, du rein et du poumon, les activités de ces deux derniers organes sont très voisines. Le coeur et le cerveau sont pratiquement inactifs.

Ces résultats sont analogues à ceux qu'avaient trouvés DELGA et PULVER pour le chlorure de caramiphène.

IV.- Chien : Nous n'avons pu disposer que du foie, du rein et du sang de deux chiens, de sorte que nos essais n'ont qu'une valeur très relative puisque de grandes variations individuelles ont été décelées pour les autres espèces. Il est possible cependant d'affirmer que le foie de ces animaux peut contenir une quantité importante d'enzyme.

Celle trouvée dans le rein est faible, et leur sérum ou plasma sont dépourvus de toute activité hydrolysante (tableau N° 8).

o°o

Nous pouvons conclure de cette étude que tous les animaux examinés sont capables de détruire l'adiphénine mais avec des intensités variables suivant les espèces et pour chacune de celles-ci, suivant les individus. Il semble que les lapins et les cobayes possèdent dans leur organisme un pouvoir de détoxication plus important que celui des chiens et des rats : peut-être faut-il voir là, une influence de la nature de leur alimentation.

Pour un même animal, quelle que soit son espèce, il est possible de classer le pouvoir destructeur des organes dans l'ordre d'intensités décroissantes suivant :

Foie, sérum ou rein, poumon, coeur, cerveau.

Notons de plus, que la recherche de l'activité enzymatique dans les tissus suivants : muscles et purée globulaire sanguine des différents animaux s'est toujours révélée négative.

Le foie est donc toujours l'organe le plus actif, ceci justifie une fois de plus le rôle important que l'on fait jouer à cet organe dans les phénomènes de détoxications et il paraît plausible d'attribuer une origine hépatique au ferment qui détruit l'adiphénine.

TABLEAU Nº 4

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR DIFFERENTS ORGANES DE COBAYE

Méthode manométrique : Température : 37º, pH : 7,9

Réactifs		Concentrations finales
a) Organe homogénéisé :	0,20 g dans 1 ml	80 p.1000
ou sérum :	0,5 ml	200 p.1000
b) Solution d'adiphénine à 2,5 p.1000 :	0,5 ml	0,5p.1000 = $1,43.10^{-3}$M
c) Solution de Ringer bicarbonatée : q.s.p. :	2,5 ml	

Numéro de l'animal		I	II	III	IV	V	VI	Moyenne
Nature de l'organe	Temps en minutes	Activités des différents organes exprimées en µl de CO_2 dégagés						
Foie	10	51	54	23	30	33	35	38
	20	55	57	28	33	34	35	40
	30	55	60	27	33	35	36	41
Rein	10	15	20	10	11	10	10	13
	20	29	35	20	25	23	21	25
	30	45	49	29	40	32	32	38
Coeur	10	2	1	0	0	0	0	
	20	1	1	0	0	0	0	
	30	2	1	2	0	1	1	1
Poumon	10	8	9	2	6	1	0	4
	20	13	14	6	10	3	1	8
	30	20	19	11	16	3	6	12
Cerveau	10	0	4	0	0	0	0	
	20	5	5	0	0	0	0	
	30	6	5	1	0	2	0	2
Sang	10		22	15	22	29	42	27
	20		36	23	40	34	60	38
	30		48	35	55	40	79	51

TABLEAU N° 5

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR DIFFERENTS ORGANES DE RAT

Méthode manométrique : Température : 37°, pH : 7,9

Réactifs		Concentrations finales
a) Organe homogénéisé :	0,20 g dans 1 ml	80 p. 1000
ou sérum :	0,5 ml	200 p. 1000
b) Solution d'adiphénine à 2,5 p. 1000 :	0,5 ml	0,5 p. 1000 = $1,43 \cdot 10^{-3}$ M
c) Solution de Ringer bicarbonatée : q.s.p. :	2,5 ml	

Numéro de l'animal		I	II	III	IV	V	Moyenne
Nature de l'organe	Temps en minutes	Activités des différents organes exprimées en µl de CO_2 dégagés					
Foie	10	6	27	0	3	18	11
	20	10	32	0	6	30	16
	30	13	33	0	9	34	18
Rein	10	0	0	0	0	0	
	20	0	0	0	0	0	
	30	0	0	0	0	0	0
Sérum	10	6	7	2	0		4
	20	12	13	4	4		8
	30	13	16	6	9		11
Poumon	10	0	0	0			
	20	0	0	0			
	30	0	0	0			0
Coeur	10	0	0	0			
	20	0	0	0			
	30	0	0	0			0
Cerveau	10	0	0	0			
	20	0	0	0			
	30	0	0	0			0

TABLEAU N° 6

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR DIFFERENTS ORGANES DU LAPIN

Méthode manométrique : Température : 37°, pH : 7,9

Réactifs		Concentrations finales
a) Organe homogénéisé :	0,20 g dans	1 ml 80 p.1000
ou sérum :		0,5 ml 200 p.1000
b) Solution d'adiphénine à 2,5 p.1000 :		0,5 ml 0,5 p.1000=1,43.10^{-3}M
c) Solution de Ringer bicarbonatée : q.s.p. :		2,5 ml

Caractérisation de l'animal		Domestique I	Garenne I	Garenne II	Garenne III	Moyenne garenne
Nature de l'organe	Temps en minutes	Activités des différents organes exprimées en µl de CO_2 dégagée				
Foie	5	17	37	32	22	30
	10	32	48	41	38	42
	20	37	55	44	50	50
	30	37	55	44	51	50
Rein	5	5	7	9	4	7
	10	10	14	18	7	13
	20	21	27	30	11	23
	30	31	31	36	14	27
Sérum	5	0	32	26	11	23
	10	0	54	55	20	43
	20	0	55	56	36	49
	30	2	55	56	41	51
Poumon	5	4	8	8		8
	10	6	14	16		15
	20	10	28	30		29
	30	12	38	39		38
Coeur	30	3	9	6		7
Cerveau	30	0	0	0		

TABLEAU N° 7

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR LE SERUM DE LAPIN

Méthode manométrique : Température 37°, pH : 7,9

Réactifs		Concentrations finales
a) Sérum :	de 0,1 à 0,5 ml	40 à 200 p. 1000
b) Solution d'adiphénine à 2,5 p. 1000 :	0,5 ml	0,5 p. 1000=1,43. 10^{-3}M
c) Solution de Ringer bicarbonatée : q.s.p. :	2,5 ml	

Temps en minutes à 37°		5	10	15	20	25	30	60
Caractérisation de l'animal	Quantité de sérum en ml	Activités exprimées en µl de CO_2 dégagés						
Domestique N° 2	0,1	4	8	12	16	20	23	41
	0,2	6	11	18	25	30	35	46
	0,3	9	16	26	34		41	-
	0,4	11	21	30	38		40	-
	0,5	14	28	43	55		56	
Domestique N° 3	0,5	7	-	-	9	-	10	
Domestique N° 4	0,5	8	-	-	-	-	8	
Domestique N° 5	0,5	0	-	-	-	-	3	
Garenne IV	0,5	32	51	52	-	-	52	
Garenne V	0,5	15	27	40	53	59	59	
Garenne VI	0,5	15	40	56	57	-	57	
Garenne VII	0,5	0	0	0	0	0	0	

TABLEAU N° 8

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR DIFFERENTS ORGANES DE CHIEN

Méthode manométrique : Température : 37°, pH : 7,9

Réactifs		Concentrations finales
a) Organe homogénéisé :	0,20 g dans 1 ml	80 p. 1000
ou sérum :	0,5 ml	200 p. 1000
b) Solution d'adiphénine à 2,5 p. 1000 :	0,5 ml	0,5 p. 1000 = $1,43.10^{-3}$M
c) Solution de Ringer bicarbonatée : q.s.p. :	2,5 ml	

Caractérisation de l'animal		Chien N° 1	Chien N° 2	Moyenne
Nature de l'organe	Temps en minutes	Activités exprimées en µl de CO_2 dégagés		
Foie	10 20 30	12 26 34	24 32 36	18 29 35
Rein	10 20 30	1 6 11	0 0 6	8
Sérum	10 20 30	0 0 0	0 0 0	0

CHAPITRE II

HYDROLYSE ENZYMATIQUE ET CHIMIQUE DE QUELQUES ESTERS DU DIETHYL AMINOETHANOL

I - HYDROLYSE COMPAREE DES ESTERS PAR L'ESTERASE DU FOIE DE COBAYE.

Le foie de Cobaye constitue, nous l'avons vu, une des meilleures sources de l'enzyme capable d'hydrolyser l'adiphénine ; c'est donc à cet organe que nous avons fait appel pour étudier la destruction enzymatique des esters du diéthylaminoéthanol voisins. Ceux-ci sont-ils comme l'adiphénine, décomposés par l'esterase hépatique ?

Les travaux déjà cités sur l'hydrolyse du chlorure de caramiphène, nous laissaient entrevoir, en partie il est vrai, une réponse affirmative à cette question. Nous avons voulu cependant étendre la comparaison aux esters suivants : propivane, chlorure de diméthylcaramiphène , hexahydroadiphénine; puis préciser les rapports existant entre les vitesses d'hydrolyse de chacun de ces produits, grâce à l'application de conditions expérimentales identiques.

Ces recherches permettront de juger de la spécificité de la diastase étudiée. Elles présentent de plus un intérêt pharmacodynamique certain, puisqu'elles montreront l'influence sur l'hydrolyse enzymatique des différents substituants du radical acide commun à ce groupe d'esters, et celle-ci peut fort bien n'être pas sans rapport avec les différences de toxicité qui existent entre ces médicaments.

Deux séries de préparations diastasiques ont été utilisées : des homogénats de foie frais et des suspensions de poudre acétoniques de foies de cobayes.

A - Hydrolyse des esters par des homogenats de foie de Cobaye.

Mode opératoire : introduire dans un tube à essais 5 ml d'homogénat de foie à la concentration de 50 mg d'organe frais par ml de tampon phosphaté M/15 à pH 7,2. Après dix minutes de séjour au thermostat à 37º ajouter 5 ml de solution contenant 0,5 mg/ml de l'ester étudié dans ce même tampon, préalablement amenée à 37º. Maintenir ce mélange au thermostat. Au bout de temps déterminés, prélever 2 ml du mélange et les verser aussitôt dans 8 ml d'alcool tartrique. Le dosage des quantités d'esters non hydrolysés est effectué suivant la technique colorimétrique : il permet de calculer le pourcentage de l'hydrolyse.

Les essais dont les résultats sont contenus dans le tableau Nº 9 confirment l'hydrolyse de tous les esters étudiés par les foies de plusieurs animaux. Les vitesses d'hydrolyses sont très différentes d'un ester à l'autre; mais aussi bien à l'égard de l'adiphénine que des quatre autres esters, le pouvoir enzymatique varie peu suivant les préparations, ce qui montre déjà qu'un facteur commun préside aux destructions esterasiques de ces médicaments.

L'utilisation des homogénats de foie ne permettait guère d'étudier de façon précise la destruction des différents esters en fonction du temps. Cette étude appelait en effet de nombreux essais, peu compatibles avec la conservation fort aléatoire des activités des suspensions d'organe frais. Nous l'avons donc réalisée en employant une préparation enzymatique stabilisée.

B - Hydrolyse des esters par une poudre acétonique de foie de Cobaye

Le mode opératoire est sensiblement le même que précédemment : introduire dans un tube à essais 5 ml de suspension contenant 10 mg de poudre de foie par ml de tampon phosphaté M/15 à pH 7,2. Porter le tube dans un thermostat à 37º et après dix minutes ajouter 5 ml de solution d'ester à 0,5 mg par ml de la même solution tampon. Au bout de temps variables, prélever 2 ml du mélange, sur lesquels l'ester restant est titré après défécation alcoolotartrique.

Nous avons ainsi suivi, en fonction du temps, les hydrolyses des cinq esters du diétylaminoéthanol; le tableau № 10 et la figure II rassemblent les résultats obtenus.

o°o

Ces deux séries d'expériences montrent que les vitesses d'hydrolyse sont très différentes suivant les esters étudiés. Le propivane est hydrolysé presque instantanément par l'esterase du foie de Cobaye, suivi par l'adiphénine dont l'hydrolyse est encore très rapide bien qu'elle se produise en un temps deux fois plus long environ. La vitesse d'hydrolyse du chlorure de caramiphène est nettement plus faible, moins cependant que celle de son dérivé diméthylé. Enfin l'hexahydroadiphénine résiste le mieux et de beaucoup, à l'action de l'esterase.

(Afin de donner une idée plus précise de ces différences, nous avons déterminé pour chacun des esters leur temps de demi-hydrolyse: Ces valeurs sont reportées dans le tableau № 12 page 54 ; elles ont été calculées par interpolation ou extrapolation d'après les valeurs les plus voisines de 50 p.100 trouvées expérimentalement).

Nous voyons donc quelle peut être l'influence de la constitution chimique de l'acide esterifiant le diéthylaminoéthanol sur la vitesse d'hydrolyse par l'enzyme. Les acides de tous les esters sont des dérivés de substitution de l'acide phénylacétique (sauf le chlorure de diméthylcaramiphène qui peut être considéré comme un dérivé de l'acide xylylacétique) et l'on peut remarquer de prime abord que la vitesse d'hydrolyse diminue au fur et à mesure que le substituant est plus lourd. En outre :

- l'introduction du carbone linéaire dans un cycle, comme c'est le cas pour le chlorure de caramiphène, augmente la résistance de la molécule à l'hydrolyse;
- la saturation d'un cycle benzénique conduit au même résultat, comme le montre la comparaison entre l'adiphénine et l'hexahydroadiphénine.

- enfin la substitution sur le noyau benzénique de deux groupements méthyle produit encore le même effet : cas du chlorure de caramiphène et du chlorure de diméthylcaramiphène.

Pour expliquer de tels résultats on ne peut s'empêcher d'évoquer l'encombrement stérique dont LESPAGNOL et ses collaborateurs [64-65-66] ainsi que GLASSON [33] ont déjà montré les effets à propos des hydrolyses chimiques et enzymatiques des dérivés de l'aspirine .

Si nous considérons, enfin, le point de vue proprement pharmacologique de cette étude, nous devons remarquer que les différences considérables qui apparaissent dans l'hydrolyse enzymatique des cinq médicaments s'opposent nettement à la similitude relative de leur toxicité ou de leur activité spasmolytique chez les animaux. Il est donc impossible de relier les deux phénomènes.

II.- HYDROLYSE COMPAREE DES ESTERS PAR LA SOUDE.

Afin de compléter les recherches précédentes, il nous a paru intéressant de comparer les vitesses d'hydrolyse des esters sous l'action non plus d'une diastase mais d'un réactif chimique. Nous avons choisi la soude à la concentration N/100 après nous être assurés par des essais préliminaires que ce réactif hydrolysait tous les esters en des temps convenables.

Le mode opératoire, très proche de ceux que nous avons indiqués pour l'hydrolyse enzymatique, est le suivant :

Dans un tube à essais maintenu à 37º, mettre 5 ml de soude N/50 en contact de 5 ml d'une solution aqueuse d'ester à 0,1 p. 1000; prélever au bout de temps variables 2 ml de mélange et titrer l'ester non décomposé par la méthode colorimétrique après neutralisation immédiate par une solution d'acide sulfurique N/50.

Le tableau Nº 11 et les courbes représentées dans la figure III traduisent les résultats obtenus.

Pour pouvoir chiffrer la sensibilité à l'hydrolyse des différents esters, nous avons ici encore, calculé pour chacun d'eux les

temps de demi-hydrolyse; ils sont exposés dans le tableau № 12.

De tous les esters étudiés, l'adiphénine est le plus sensible à l'action hydrolysante de la soude. La sensibilité du propivane est nettement plus faible; cependant l'ordre de grandeur de la vitesse d'hydrolyse de ces deux esters est le même puisqu'il ne faut que quelques minutes de contact avec l'alcali pour scinder 50 p. 100 des quantités mises en oeuvre.

Il en est tout autrement pour le chlorure de caramiphène, le chlorure de diméthylcaramiphène et l'hexahydroadiphénine dont les temps de demi-hydrolyse se chiffrent par plusieurs heures. Leurs vitesses d'hydrolyse, encore très différentes, se classent dans l'ordre décroissant du premier au dernier cité de ces esters.

Si nous comparons maintenant l'hydrolyse alcaline à l'hydrolyse enzymatique, nous constatons que l'influence de la constitution chimique des esters sur les rapidités d'hydrolyse est sensiblement analogue dans les deux cas; une différence cependant : propivane et adiphénine s'ordonnent de façon inverse. Mais les écarts sont faibles et l'analogie devient totale si l'on oppose à la labilité de ces deux produits, le comportement des trois autres esters.

Ceci tendrait à faire admettre que les mécanismes intimes de la lyse enzymatique et de la lyse chimique sont étroitement liés.

TABLEAU N° 9

HYDROLYSE DES ESTERS PAR LE FOIE DE COBAYE

Technique colorimétrique : Température : 37°, pH : 7,2

Réactifs		Concentrations finales
a) organe homogénéisé dans (c)	0,25g ds 1ml	25 p. 1000
b) solution d'ester dans (c) à 0,5mg/ml	5ml	0,25 p.1.000 = $7,2.10^{-4}$M
c) solution tampon phosphaté M/15 à pH 7,2	4ml	

ESTERS	Temps en minutes	Foie I	Foie II	Foie III	Foie IV	Moyenne
		Pourcentage d'hydrolyse				
Propivand	3	90	95	92	95	93
	15	100	100	100	100	100
Adiphénine	3	45	52	50	50	49
	15	100	100	100	100	100
Chlorure de caramiphène	3	-	-	20	20	20
	15	80	73	81	80	78,5
	30	100	100	100	100	100
Chlorure de diméthylcaramiphène	15	12	14	34	16	19
	30	64	50	64	48	56,5
Hexahydro adiphénine	15	16	5	12	8	10
	30	40	22	28	24	29

TABLEAU Nº 10

HYDROLYSE DES ESTERS PAR UNE POUDRE ACETONIQUE DE FOIE DE COBAYE

Technique colorimétrique : Température : 37º, pH : 7,2

Réactifs		Concentrations finales
a) Poudre acétonique en suspension dans (c)	50mg dans 1ml	5g p.1.000
b) Solution d'ester dans (c) à 0,5mg/ml	5ml	0,25g p.1.000= $7,2.10^{-4}$M
c) Solution tampon phosphatée M/15 à pH 7,2	4ml	

Temps en minutes	Propivane	Adiphénine	Chlorure de caramiphène	Chlorure de diméthyl-caramiphène	Hexahydro-adiphénine
	Pourcentage d'hydrolyse				
2	60	28			
4	80	50			
6	93	69			
8	100				
10		90	40		
15		100	57	27	14
20			64		
30			80	53	35
45				71	56
50			100		
60				74	70

DE FOIE DE COBAYE

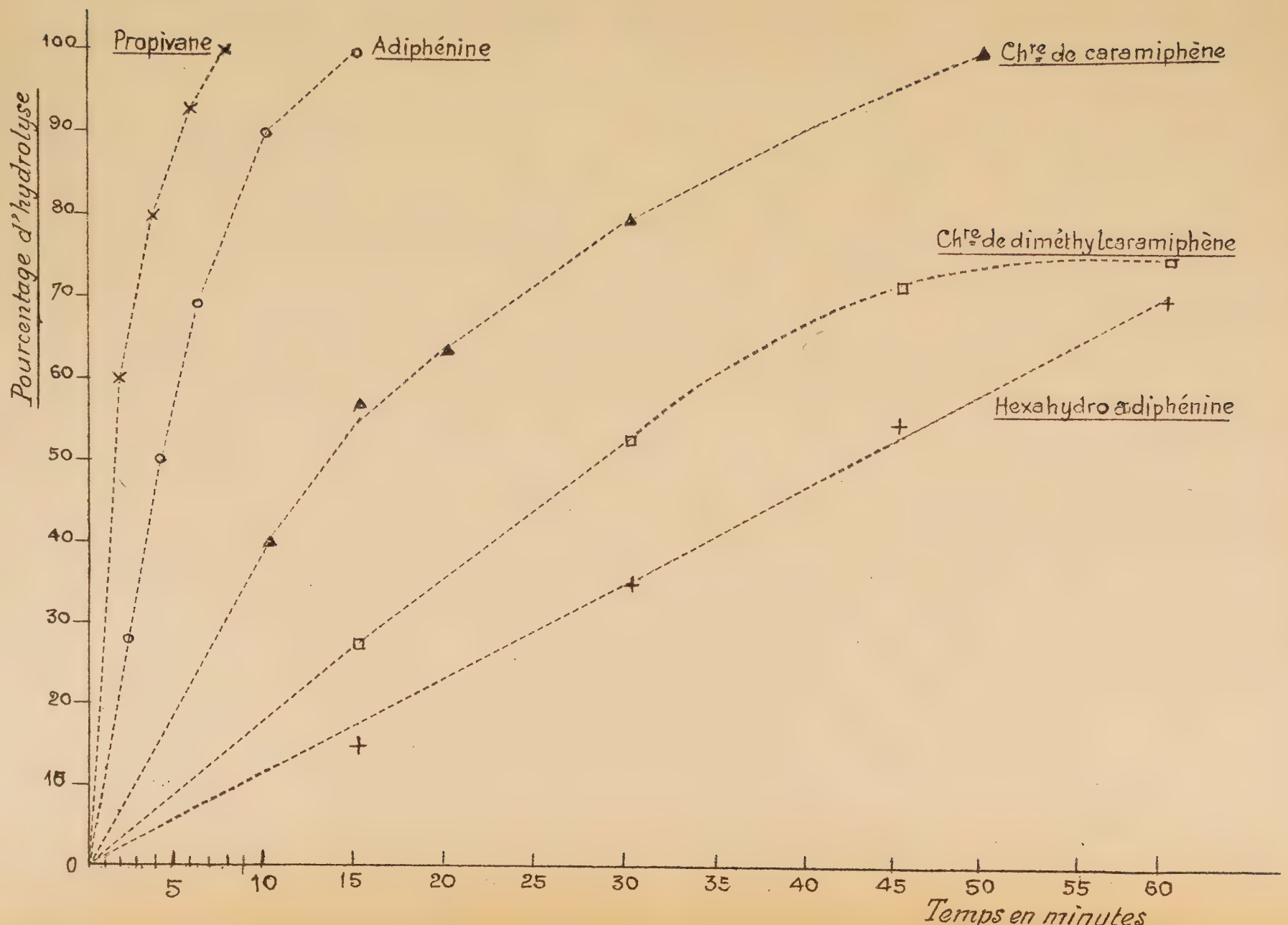


TABLEAU Nº 11

HYDROLYSE DES ESTERS PAR LA SOUDE N/100

Technique colorimétrique : Température 37º;

Réactifs		Concentrations finales
a) Solution aqueuse d'ester à 0,1 p. 1000	5 ml	0,05 p.1000=1,4.10^{-5} M
b) Solution de Na OH N/50	5 ml	N/100

Temps en minutes	Pourcentage d'hydrolyse		Temps en heures	Pourcentage d'hydrolyse		
	Adiphénine	Propivane		Chlorure de caramiphène	Chlorure de diméthylcaramiphène	Hexahydroadiphénine
2,5	48		5	45	12	6
5	66	25	16	89	38	31
10	83	49	23	97	55	42
15	92		39	100	80	63
20		63	48		89	76
30	100	80	72		100	92
45		89	97			97
60		98	120			100

HYDROLYSE DES ESTERS PAR LA SOUDE N/100

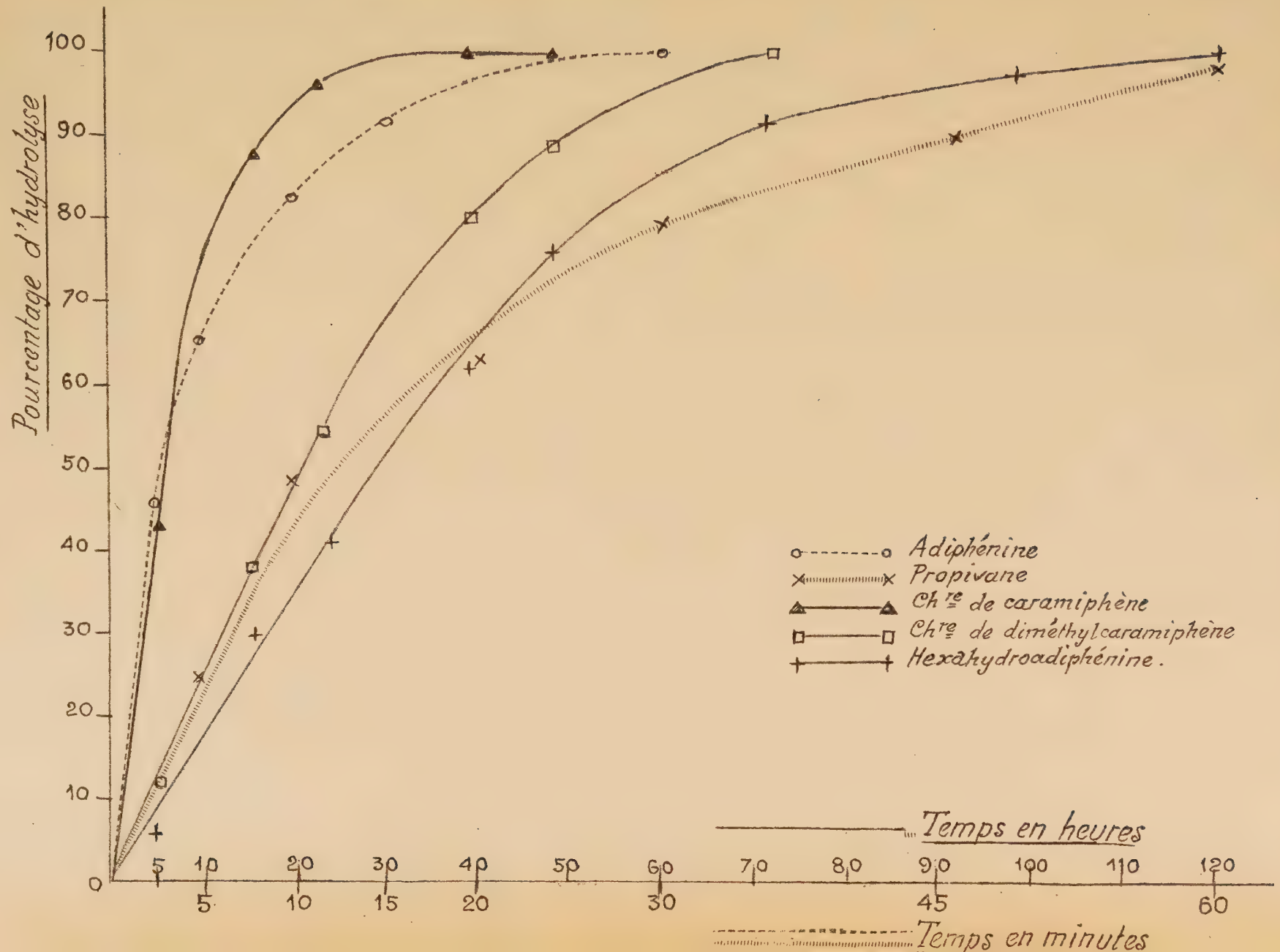


TABLEAU N° 12

TEMPS DE DEMI-HYDROLYSE DES ESTERS

PAR VOIE CHIMIQUE ET PAR VOIE ENZYMATIQUE

NATURE DE L'ESTER	NATURE DE L'AGENT HYDROLYSANT		
	Soude N/100	Homogénat de foie	Poudre acétonique
Propivane	10 Minutes	< 2 Minutes	< 2 Minutes
Adiphéniné	3 Minutes	< 3 Minutes	4 Minutes
Ch^re de caramiphène	5 heures 30	9 Minutes 30	13 Minutes
Ch^re de diméthyl-caramiphène	21 heures	26 Minutes 30	28 Minutes
Hexahydroadiphéniné	28 heures 30	52 Minutes	43 Minutes

CHAPITRE III

RECHERCHES SPECIALES RELATIVES A L'ACTION DU SERUM SUR LES ESTERS ETUDIES.

De nombreuses substances peuvent être transformées par le sérum en produits moins toxiques. Nous avons signalé quelques exemples de ces transformations dans l'introduction de cette thèse et vu que, parmi celles-ci, plusieurs sont imputables aux enzymes contenus dans la fraction non figurée du sang (plasma ou sérum).

La nature protéique de ces enzymes (ou tout au moins celle du groupe auquel elle appartient) a été parfois déterminée : on sait par exemple que l'activité cholinesterasique du sérum est entraînée par la fraction IV_4 de COHN [18- 91] et est localisée au niveau des globulines [84] . Or, AUGUSTINSSON [8] estime que toutes les diastases hydrolysant les esters voisins de l'acétylcholine: procaïnesterase et parpanitesterase en particulier, sont identiques à la cholinesterase. S'il en est ainsi l'enzyme hydrolysant l'adiphénine doit également appartenir à ce même groupe de protéines lorsque le sérum en contient.

Ceci nous a conduit à poursuivre l'étude de la localisation de l'enzyme dans le sérum jusqu'au niveau moléculaire.

Le cas du sérum humain est particulier; doué de pouvoir esterasique à l'égard de substances aussi différentes que le sont l'acétylcholine, la procaïne, l'aspirine ou même certains triesters du glycérol, le sérum humain ne peut hydrolyser ni l'adiphénine, ni le chlorure de caramiphène comme l'ont montré PULVER [87] et GLASSON [33] . Nous avons cependant tenu à confirmer pour l'ensemble des esters que nous étudions, le manque de réactivité de sérums provenant de sujets sains et à rechercher celle de sérums pathologiques.

En effet les travaux de BENARD et collaborateurs [11] nous permettaient de supposer que le parenchyme hépatique lésé laisserait passer l'esterase dans le sérum; et la mesure de l'activité hydrolysante du sérum humain vis-à-vis de l'adiphénine constituerait un test de l'insuffisance hépatique, comme l'est la mesure de l'activité procaïnesterasique, ces deux tests étant en quelque sorte inverses l'un de l'autre (voir page 6).

De plus, il n'était pas impossible que le pouvoir esterasique du sérum humain soit masqué par la présence simultanée d'un inhibiteur n'agissant qu'à l'égard de l'adiphénine ou du chlorure de caramiphène. Si cet inhibiteur n'est pas entraîné avec la même fraction de protéines que celle contenant l'enzyme, l'activité du sérum, vis-à-vis de l'adiphénine par exemple, pourra être mise en évidence dans la fraction active.

L'ensemble des recherches traitées dans ce chapître sera divisé en deux parties :

1º- Activités de diverses fractions protéiniques de sérums hydrolysant l'adiphénine.

2º- Etude de l'action du sérum humain sur les divers esters.

I - ACTIVITES DE DIVERSES FRACTIONS PROTEINIQUES DE SERUMS DE LAPINS HYDROLYSANT L'ADIPHENINE.

Leur grande activité et la possibilité d'en obtenir une quantité suffisante nous ont conduit à utiliser comme source d'enzyme un mélange de sérums ou de plasmas de lapins (1).

Les fractionnements des protéines ont été réalisés par l'emploi de deux méthodes :

A/- Les protéines sériques par relargage au moyen d'une solution saturée de sulfate d'ammonium.

B/- Les protéines plasmatiques par précipitation à l'éthanol.

---

(1)- Les plasmas sont citratés (cf. page 30). Nous verrons plus loin que le citrate de sodium ne modifie pas l'activité de l'enzyme.

A/- Fractions sériques obtenues par relargage.

Le principe de la précipitation fractionnée des protéines réside ici dans la modification de la force ionique du sérum.

Le mode opératoire est le suivant :

Dans chaque tube à centrifuger d'une série de 10, introduire 1, 2, 3, 4 ... 8, 9 ml de solution saturée de sulfate d'ammonium, puis respectivement 8, 7, 6 ... 1,0 ml d'eau distillée, et, après mélange ajouter 1 ml de sérum de Lapin. Agiter à nouveau le mélange et abandonner deux jours à la glacière à +4º. Centrifuger lorsqu'il s'est formé un précipité suffisamment abondant pour être recueilli (ce qui se produit pour une teneur en sulfate d'ammonium égale au moins à 30 p. 100 de la saturation), décanter le liquide surnageant et redissoudre le précipité dans le minimum de sérum physiologique (solution de chlorure de sodium à 0,9 p. 100). Dialyser alors pendant 24 heures cette solution, sous pression dans un petit tube en cellophane, contre une solution de phosphate tampon M/15 pH 7,2, à + 4º. Après dialyse compléter le volume à 10 ml (1 ml de la solution de protéine correspond ainsi à 1 ml de sérum dilué au 1/10ème) puis déterminer d'après la méthode colorimétrique l'activité enzymatique de chacune des fractions obtenues.

Parallèlement à cette détermination, le taux des protéines totales de chaque fraction est dosé d'après la méthode au Biuret.

Enfin les mobilités électrophorétiques des protéines précipitées et redissoutes sont recherchées au moyen de l'appareil de MACHEBOEUF et collaborateurs [73] et comparées à celles des protéines du sérum total.

Nous avons condensé dans le tableau Nº 13 les résultats des dosages. Sa lecture montre que l'activité enzymatique du précipité apparaît brusquement pour une teneur en sulfate d'ammonium égale à 70 p. 100 de la saturation, puis se fixe en un palier pour des teneurs plus élevées.

Or, l'électrophorèse de chaque fraction, interprétée d'après

les indications de MACHEBOEUF [32] indique qu'à une activité enzymatique notable correspond l'apparition d'une tache nette, liée à la présence d'α globulines et d'albumines.

Ceci localise la nature de la protéine qui supporte l'activité enzymatique à l'égard de l'adiphénine.

TABLEAU Nº 13

ACTION SUR L'ADIPHENINE DES DIFFERENTES FRACTIONS DE SERUM DE LAPIN OBTENUES PAR RELARGAGE

Méthode colorimétrique : Température : 37º ; pH : 7,2; volume réactionnel : 5ml
Concentration finale en adiphénine : 0,25 p. 1000 ($7,2.10^{-4}$M) ; protéines totales d'après la méthode au Biuret.

	Protéines totales en g p. 1000	Volume utilisé en ml	Concentration finale en protéine en g p. 1000	Pourcentage d'hydrolyse	
				après 20 min.	après 30 min.
Sérum dilué au 1/10	6	2,5	3	44	100
o/o de saturation en $SO_4(NH_4)_2$					
Fraction 1 30	très faible	3,75			0
Fraction 2 40	très faible	3,75			0
Fraction 3 50	0,09	3,75	0,70		0
Fraction 4 60	0,11	3,75	0,80		0
Fraction 5 70	2,26	2,5	1,1	20	
Fraction 6 80	2,65	2,5	1,3	14	
Fraction 7 90	3,16	2,5	1,6	20	
Fraction 8 100	3,40	2,5	1,7	18	

B/- Fractions plasmatiques obtenues par précipitation à l'éthanol.

Ce fractionnement a été réalisé par le Pharmacien Commandant ARDRY (1) qui a appliqué au plasma de lapin, la méthode 6-9 de COHN [18] - ONCLEY [81] modifiée par ARDRY [3] , de fractionnement du plasma humain.

Dans ce procédé, la précipitation fractionnée des protéines est obtenue par la diminution de la constante diélectrique du sérum, consécutive à l'addition d'éthanol.

On opère à pH et à force ionique déterminés. La température est abaissée pour éviter la dénaturation.

Le schéma des opérations exposé au tableau № 14 nous dispense d'une longue description.

Les cinq fractions protéiniques principales sont les suivantes : (leur sous-fractionnement ultérieur est possible) :

- Fraction I , fibrinogène et globuline antihémophilique.
- Fraction II , γ globulines, et III: βlipoprotéines, prothrombine, iso-hémo-agglutinines .
- Fraction IV , α lipoprotéines, α et β globulines .
- Fraction V , albumines .

Ces différentes fractions sont dialysées sous pression pendant 24 h., à 4º, contre une solution de phosphate tampon pH 7,2. Puis leur activité enzymatique est déterminée vis-à-vis de l'adiphénine en suivant la technique habituelle.

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus (tableau № 15) nous avons fait figurer dans ce tableau les concentrations en protéines totales de chacune des fractions, ainsi que celles des milieux réactionnels. Les taux de protéines ont été calculés par le dosage de l'azote total après destruction sulfurique (acide sulfurique et catalyseur au sélénium : sélénium 5 g ; sulfate de sodium anhydre 95 g) suivant la méthode de KJELDAHL, le coëfficient de transformation de l'azote en protéine étant 6,25 .

---

(1)- Nous exprimons à Monsieur le Pharmacien Commandant R. ARDRY, Chef de service de Physico-Chimie à l'Etablissement Central de Transfusion-Réanimation de l'Armée, nos plus vifs remerciements.

Enfin, ici encore, les solutions des fractions protéiniques ont été soumises à l'électrophorèse sur papier (selon MACHEBOEUF [73]) en prenant comme référence le plasma lui-même, afin de pouvoir contrôler l'identité des protéines qui les constituaient (cliché № 1).

La lecture des résultats (tableau № 15) révèle que seules les fractions IV (α lipoprotéines α et β globulines) et V (albumines) présentent une activité notable, cependant qu'une légère hydrolyse de l'adiphénine apparaît pour la fraction I; mais celle-ci est due très vraisemblablement à la présence dans cette fraction d'une partie des albumines comme nous le prouve l'électrophorèse.

La fraction V (albumines) est de beaucoup la plus active et représente à peu près 60 p. 100 des protéines du plasma. Un calcul approximatif nous montre qu'elle possède une activité 3 à 5 fois supérieure à celle du plasma, pour des mêmes concentrations en protéines, alors qu'elle ne devrait être que 1,75 fois plus élevée (ceci suppose que toute l'activité enzymatique est liée aux albumines).

Ainsi, le fractionnement des protéines plasmatiques par la méthode de COHN et par la méthode de précipitation saline permet, non seulement de lier l'activité enzymatique aux albumines et, pour une plus faible part, aux globulines, mais il permet de plus de supposer que l'isolement de la fraction active s'accompagne d'une augmentation de l'activité de celle-ci, par rapport à son comportement dans le plasma total (1). Il n'est donc pas impossible que l'une ou l'autre des fractions inactives contienne un inhibiteur de la réaction diastasique.

---

(1)- Il est en effet plus difficile de penser que le seul traitement physico-chimique que subissent les protéines au cours du fractionnement, soit responsable d'une augmentation de l'activité.

TABLEAU N° 14

SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DU PLASMA SUIVANT
LA METHODE . 6-9 DE COHN, ONCLEY, MODIFIEE PAR ARDRY

PLASMA

10% EtOH à 15°; pH 7,2; temp. : - 3°

Surnageant
4 ml/1 ac. citrique 0,6M pH 6,6
240 ml/1 EtOH; temp. : - 5°
pH final : 6,9

Précipité : FRACTION I
Fibrinogène, globuline
anti-hémophilique
remis en solution dans vol.égal au précipité de sol. Citrate Na 2%
ClNa 0,8%

Surnageant
100ml/1 ac. citrique 0,6 M
400ml/1 EtOH
170ml/1 H_2O
pH final : 5,8; temp. : - 5°

Précipité II-III
redissous par kg dans :
8 l H_2O;200ml NaCl 0,9%
20ml NaOH N/10 pH 7,2
2,66 l EtOH; temp. : - 5°

Surnageant
20ml/1 ac.citrique 0,6M
20ml/1 EtOH
pH : 4,8
temp. : - 5°

Précipité : FRACTION IV
α lipoprotéines
α et β globulines
redissous dans sol. NaCl 0,9%

Surnageant
rejeté

Précipité : FRACTION V
Albumines
redissous dans sol. NaCl 0,9%

Surnageant
égal vol. EtOH (1
temp. : - 5°

Précipité II-III-IV
redissous par kg dans
600ml ClNa 0,9%+12,5 l H_2O
20ml ac.citrique 0,6M
pH : 5,2 temp. : 0°

Surnageant
rejeté

Précipité : FRACTION III$_\alpha$
β lipoprotéines
redissous dans NaCl 0,9%

Surnageant
340ml/1 EtOH
pH 7,2 (NaOH)
temp. : - 5°

Précipité : FRACTION III$_1$
Prothrombine
redissous dans NaCl 0,9%

Surnageant
rejeté

Précipité : FRACTION II
γ globulines
redissous dans NaCl 0,9%

1 - Opération spéciale aux petites quantités

CLICHE Nº I

MOBILITES ELECTROPHORETIQUES

DES FRACTIONS PROTEINIQUES DU PLASMA DE LAPIN

(Fractionnement à l'éthanol)

S.N. = Plasma total

I = Fraction I

II = Fraction II

III = Fraction III $\beta + III_1$

IV = Fraction IV

V = Fraction V

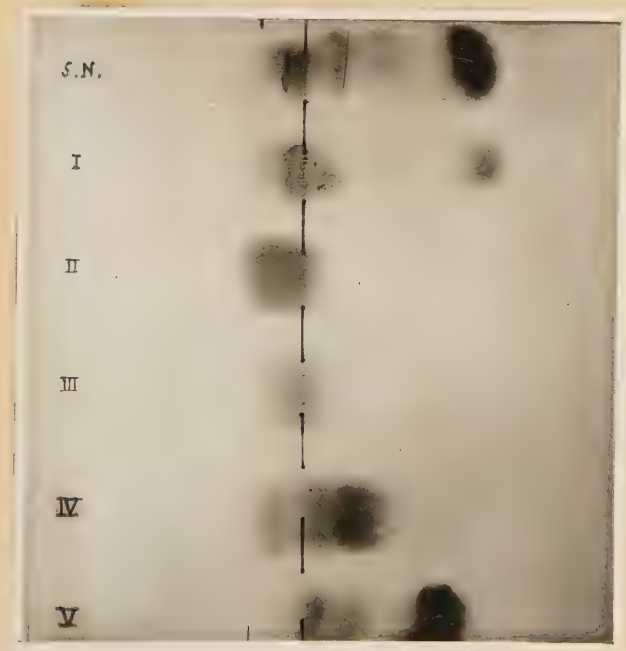


TABLEAU Nº 15

ACTION SUR L'ADIPHENINE DES DIFFERENTES FRACTIONS DE PLASMA DE LAPIN OBTENUES PAR PRECIPITATION A L'ETHANOL

Méthode colorimétrique : température : 37º; pH : 7,2; volume réactionnel : 5 ml;

Concentration finale en adiphénine : 0,25 p.1000 ($7,2.10^{-4}$M); protéines totales d'après le taux d'azote selon KJELDAHL (coefficient de transformation de l'azote en protéine : 6,25).

	Protéines totales en g p 1.000	Pourcentage des protéines totales	Volume utilisé pour l'expérience en ml	Concentration finale en protéine en g p.1000	Pourcentage d'hydrolyse			
					5min.	10 min.	20 min.	30 min.
Plasma	49,5	100	0,25	2,47	10	22	44	
Fraction I	10	9,1	2,5	5,0	-	-	-	16
Fraction II	11,5	8,6	2,5	5,7	-	-	-	0
Fraction III_0 + III_1	5,2	3,8	2,5	2,6	-	-	-	2
Fraction IV	23,6	17,2	2,5	11,8	-	-	100	100
			1,25	5,9	-	21	44	62
Fraction V	60,5	61	1,25	6,0	-	100	100	100
			0,25	3,0	60	85	100	100

II - ACTIVITE ENZYMATIQUE DU SANG HUMAIN.

Dans une première série de recherches, nous avons tenté de mettre en évidence l'action hydrolysante du sang humain ou de son sérum :

1º- sur l'adiphénine,

2º- sur les autres esters étudiés.

Dans une deuxième partie, nous avons opéré sur différentes fractions de mélanges de plasma humain, séparées suivant la méthode de COHN déjà décrite.

Dans tous les cas, nous avons utilisé la technique suivante : Des volumes égaux de liquides dont nous voulions déterminer l'activité enzymatique et de solution de l'ester à 5 p. 1.000 dans l'eau distillée ou dans une solution de phosphate tampon à pH 7,2 sont mélangés dans un tube à essais à 37º. Au bout de temps variables le pourcentage d'hydrolyse est évalué selon la méthode colorimétrique habituelle après défécation alcoolo-tartrique.

A - Destruction de l'adiphénine par le sang ou le sérum.

Des expériences portant sur plus de trente sérums normaux ou pathologiques (provenant de sujets diabétiques, cirrhotiques, ictériques, urémiques) nous ont montré qu'après une heure de contact avec la solution d'adiphénine le sérum hydrolysait moins de 20 p. 100 du substrat mis en oeuvre.

Or, la comparaison de ce résultat avec ceux des témoins (substitution du sérum par l'eau distillée) indiquait que cette faible hydrolyse pouvait n'être due qu'à la seule réaction ionique du milieu. Bien mieux, si l'on prolonge le contact des solutions au-delà d'une heure, on constate que la présence du sérum ralentit très sensiblement l'hydrolyse de l'adiphénine en solution tamponnée, ainsi que le révèle la lecture du tableau Nº 16 et l'examen du graphique IV. Cette influence retardatrice du sérum est particulièrement nette pour les essais de longue durée.

TABLEAU Nº 16

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR LE SERUM HUMAIN ET PAR UNE SOLUTION TAMPON PHOSPHATEE à pH 7,2

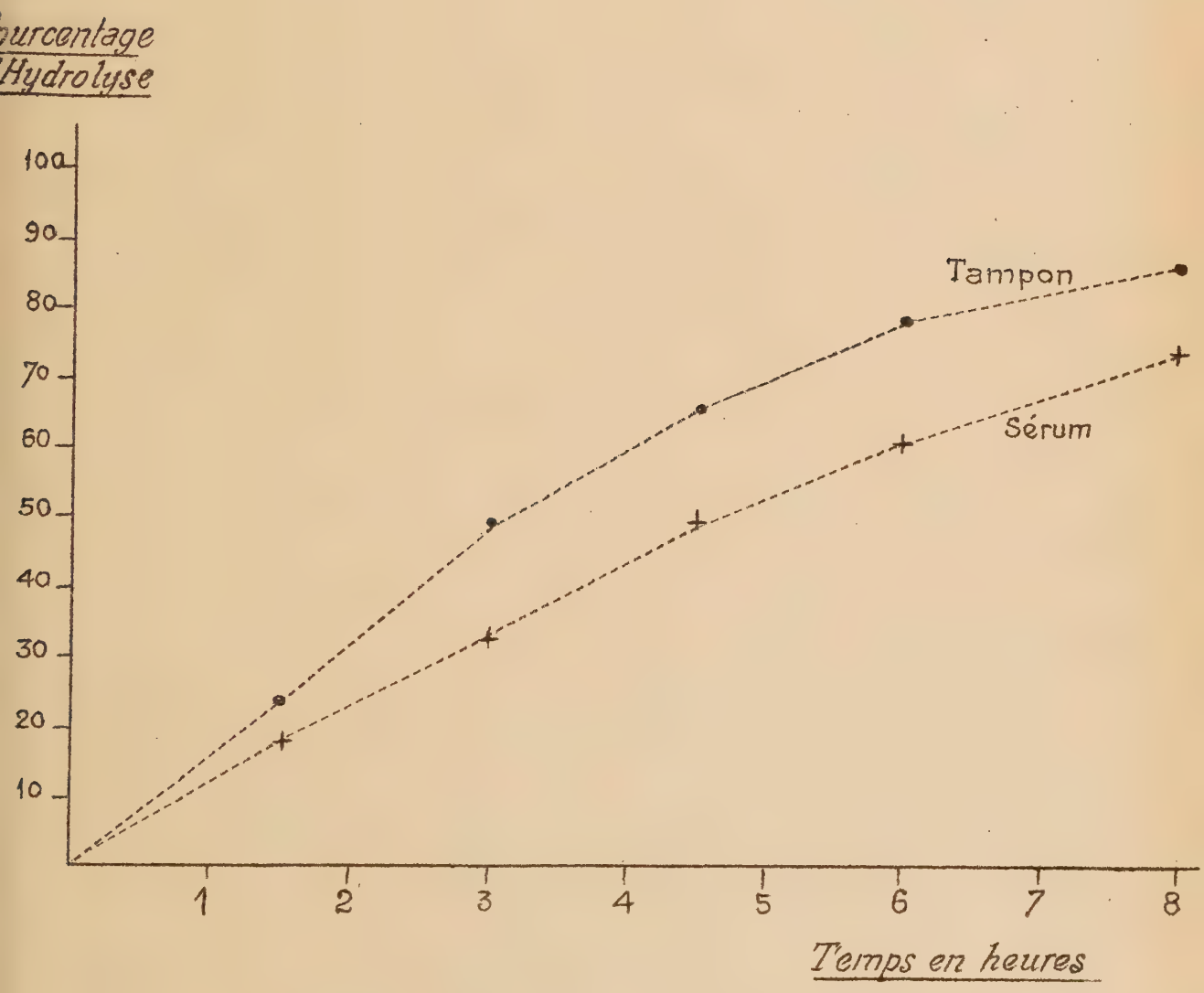
Méthode colorimétrique : température : 37º ; pH : 7,2

Réactifs		Concentrations finales
a) Sérum	5ml	500 p.1.000
ou eau distillée	5 ml	
b) Solution d'adiphénine à 0,5 p.1.000 dans le tampon phosphaté	5 ml	0,25 p.1.000 = $7,2.10^{-4}$M

Temps de contact	1^h30	3^h	4^h30	6^h	8^h	24^h
	Pourcentage d'hydrolyse					
Sérum I	18	34	50	60	76	100
- II	10	34	50	60	76	100
- III	4	36	40	58	76	100
- IV	29	33	56	70	84	-
- V	28	33	57	67	72	-
Moyenne	18	34	51	63	77	100
Tampon phosphaté : pH 7,2 valeurs moyennes de 3 expériences	23	50	68	80	90	100

FIGURE IV

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE PAR LE SERUM HUMAIN ET PAR UNE SOLUTION TAMPON à pH 7,2



Signalons d'autre part que des essais de destruction de l'adiphénine par du sang humain défibriné ou par des purées globulaires obtenues par centrifugation de sang citraté, ne nous ont jamais permis d'attribuer un caractère enzymatique aux très faibles hydrolyses observées.

B - Destruction des autres esters -

Aucun des autres esters n'est hydrolysé en une heure par le sérum humain (une trentaine de sérums ont été examinés).

Si le temps de contact du sérum avec le substrat est prolongé, il n'est possible de déceler une hydrolyse notable que dans le cas du propivane (voir tableau nº 17). La vitesse d'hydrolyse de ce produit est toutefois inférieure à celle de l'adiphénine, ce qui est conforme aux résultats trouvés lors de l'étude de l'hydrolyse par voie chimique.

TABLEAU Nº 17

DESTRUCTION DES DIFFERENTS ESTERS PAR LE SERUM HUMAIN

Méthode colorimétrique : température 37º

Réactifs		Concentrations finales
Sérum :	5 ml	
Adiphénine en solution aqueuse à 5 p. 1000 :	5 ml	0,25 p. 1000 = $7,2.10^{-4}$ M

Temps de contact	2^h	5^h	15^h	25^h
	Pourcentage d'hydrolyse			
Adiphénine	29	60	100	100
Propivane	3	43	91	97
Ch^{re} de caramiphène	5	4	4	4
Ch^{re} de diméthylcaram'phène	2	2	1	1
Hexahydroadiphénine	2	3	2	2

C - Recherche de l'enzyme dans différentes fractions plasmatiques.

Le fractionnement du plasma humain, suivant la méthode de COHN modifiée par ARDRY, telle qu'il a été schématisé précédemment, aboutit à l'obtention de six solutions contenant chacune un ou plusieurs groupes de protéines; leur nature est indiquée dans le tableau № 18 à côté de leur teneur en protéines totales et de leur activité enzymatique. Celle-ci est dans tous les cas nulle ou négligeable.

Ainsi tous nos essais, venant confirmer ceux de PULVER [87] et de GLASSON [33] , démontrent l'absence d'activité enzymatique du sérum humain à l'égard de l'ensemble des esters étudiés.

Mais une question reste obscure : la stabilité de ces esters dans le sérum humain doit-elle être attribuée à l'importance des substituants de leur groupement acétylé, puisque des esters moins "encombrés" tels que l'acétyl-,le diéthyl-acétyl - et le benzyl-acétyl-diéthylaminoéthanol sont hydrolysés dans le sérum à des taux voisins de ceux de l'aspirine (GLASSON [33]) ? En d'autres termes, l'apparition du pouvoir enzymatique du sérum à l'égard d'une large série d'esters est-elle liée à un seuil d'activité suffisant pour certains d'entre eux, insuffisant pour d'autres, rendant ainsi possible l'hydrolyse de l'aspirine et celle des premiers termes de la série des dérivés acétylés du diéthylaminoéthanol, mais ne permettant pas celle de l'adiphénine ? Si cette hypothèse peut être appliquée à l'hydrolyse enzymatique des dérivés du diéthylaminoéthanol, il semble difficile en revanche de s'y référer pour expliquer la destruction de l'aspirine et la stabilité de l'adiphénine dans le sérum humain. En effet la résistance relative de l'aspirine à l'esterase du foie de Cobaye, comparable à celle du chlorure de caramiphène (GLASSON [33]) et a fortiori beaucoupplus importante que celle de l'adiphénine, est un argument contre cette théorie. Nous pensons donc plutôt, comme GLASSON le suggérait également, que l'adiphénine et l'aspirine sont hydrolysées par deux enzymes différents : l'un d'entre eux n'existe pas dans le sérum humain.

Nous développerons cette conclusion dans une discussion ultérieure.

TABLEAU Nº 18

ACTION SUR L'ADIPHENINE DES FRACTIONS DE PLASMA HUMAIN OBTENUES PAR LA METHODE 6-9 DE COHN ONCLEY MODIFIEE PAR ARDRY

Méthode colorimétrique : Température 37º ; pH : 7,2; taux d'azote correspondant aux protéines dosé selon KJELDAHL

Réactifs		Concentrations finales
a) Fraction plasmatique	2,5ml	
b) Solution d'adiphénine à 0,5 p. 1.000 dans le tampon phosphaté à pH 7,2	2,5ml	0,25 p.1.000 = 7,2 10^{-4} M

Nature de la fraction	Teneur en protéine : Azote totalx6.25	Pourcentage d'hydrolyse en 30 Minutes
Fraction I : fibrinogène facteur antihémophilique	14,9g p.1.000	2
Fraction II-III : γ globulines β lipoprotéines, prothrombine	28,0 -	0
Fraction II-III-W : γ globulines et prothrombine	28,0 -	2
Fraction III : prothrombine	33,8 -	0
Fraction IV : α et β lipoprotéines globulines	54,6 -	0
Fraction V : albumines	80,0 -	2

CHAPITRE IV

RECHERCHES SUR L'ACTIVITE DE L'ENZYME AU SEIN DE LA CELLULE

L'enzyme au sein des tissus n'a pas forcément les mêmes propriétés que lorsqu'il est extrait des cellules. Nous avons déjà vu en effet, que l'activité enzymatique du sérum n'était pas identique à cellesdes diverses fractions extraites de celui-ci. Aussi, connaissant le rôle important que jouent certains organes dans le processus de détoxication il nous a paru utile de rechercher dans quelle mesure les résultats obtenus précédemment, par l'emploi d'homogénats d'organes, pouvaient être transposés aux organes eux-mêmes.

Nous verrons successivement comment la comparaison de l'activité des homogénats à celle des extraits cellulaires solubles d'une part, et à celle des tissus intacts d'autre part (perfusion des organes les plus actifs: foie et rein) pourront nous renseigner sur ce point).

I - ACTION DES EXTRAITS SOLUBLES D'ORGANES.

Après avoir admis à la suite des expériences de BÜCHNER que les réactions fermentaires pouvaient se manifester en dehors de la cellule, on a constaté que certains processus diastasiques étaient liés à l'architecture cellulaire. Il en est ainsi, par exemple, des réactions d'oxydation des acides gras catalysés par les mitochondries (GREEN et NORDMANN [37]). Ces éléments cellulaires seraient encore responsables, d'après COTZIAS et DOLE [20] de l'activité histaminasique du foie de Lapin, quoique les travaux de VALETTE et coll. [37] montrent que cette diaminoxydase est dissoute dans le cytoplasme des

cellules rénales du Porc.

Il n'était donc pas inutile, avant d'aborder l'étude de la destruction de l'adiphénine in situ, de savoir si l'enzyme pouvait être totalement mis en solution dans le liquide d'extraction, ou si, au contraire, les éléments morphologiques constituant la cellule intervenaient dans l'hydrolyse de l'adiphénine.

Nous n' avons pu employer la technique de centrifugation différentielle généralement utilisée dans des recherches similaires. Le procédé suivant nous permet cependant de conclure :

Des suspensions de foie frais de Cobaye ou de la poudre acétonique, préparées selon la technique habituelle, sont mises à macérer à la glacière dans une solution de phosphate tampon à pH 7,2. La durée du contact est variable suivant les essais. Après centrifugation à 5.000 tours par minute pendant 5 minutes, le liquide surnageant est décanté puis filtré sous vide. L'activité hydrolysante du filtrat est comparée à celle de la suspension.

Les résultats trouvés sont condensés dans le tableau nº 19.

Aucune différence d'activité ne peut être notée entre le liquide clair provenant de l'organe frais et la suspension de cet organe ce qui prouve que l'enzyme n'est pas intimement lié aux éléments figurés de la cellule. Il est très soluble, donc très probablement dissous dans le cytoplasme.

Dans le cas de poudre acétonique de foie, une partie non négligeable de l'activité enzymatique (14 à 24 p. 100 environ) reste liée à la fraction non filtrable. Ceci peut être dû à des phénomènes d'adsorption qui se produisent au cours de la délipidation, ou à une insuffisance de la destruction des cellules qui retiennent une partie de l'enzyme, celui-ci n'étant pas, nous l'avons vu, dialysable.

TABLEAU Nº 19

INFLUENCE DE LA FILTRATION SUR L'ACTIVITE DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES

Méthode colorimétrique : température : 37º ; pH : 7,2

Réactifs		Concentrations finales
a) suspension d'organe frais dans (c)	0,25g dans 5ml	25 p. 1000
ou suspension de poudre acétonique dans (c)	0,02g dans 5ml	2 p. 1000
ou filtrat	5ml	
b) solution d'adiphénine dans (c) à 0,5mg/ml	5ml	0,25 p. 1000 = $7,2.10^{-4}$M
c) solution tampon phosphatée M/15 pH 7,2		

Expérience Nº	Foie frais de Cobaye		Poudre acétonique de foie de Cobaye			
	I	II	III	IV	V	VI
Temps de contact avant la filtration	1 h.	1 h.	1 h.	1 h.	24 h.	24 h.
Durée de l'hydrolyse	3 min.	3 min.	15 min.	15 min.	15 min.	15 min.
Pourcentage d'adiphénine détruite						
1) par la suspension	38	45	74	74	69	71
2) par le filtrat	38	44	58	55	59	54

II - DESTRUCTION DD L'ADIPHENINE AU COURS DE PERFUSIONS D'ORGANES ISOLES DE COBAYE.

Afin de pouvoir comparer les activités de l'enzyme telles qu'elles nous ont apparu dans les purées d'organes, à celles de tissus non lésés histologiquement, nous avons étudié successivement la destruction de l'adiphénine lors de perfusions par un liquide physiologique additionné de ce produit, des foies et des reins de cobayes. Ces organes étaient isolés des animaux; en effet la nécessité de ne pas laisser se manifester l'action hydrolysante du sang, riche en esterase, ne nous permettait pas de réaliser ces expériences in situ.

A - Perfusions de foies.

Prélèvement et montage de l'organe.

Un cobaye mâle ou femelle d'environ 400 g est sacrifié par section des carotides. Après laparotomie médiane et ouverture de la cage thoracique, le foie est mis à nu et l'on procède à son prélèvement de la façon suivante : on isole tout d'abord du diaphragme, la partie supérieure du foie qui lui est plus ou moins adhérente, puis on ligature et sectionne le tronçon thoracique de la veine cave inférieure, le canal cholédoque et enfin l'oesophage au niveau du cardia; ceci permet d'éloigner du foie, l'estomac et la masse intestinale. Il est ensuite plus facile de soulever le lobe gauche et de lier puis sectionner l'artère hépatique. Enfin on introduit dans la veine porte, en un point le plus éloigné possible du foie, une canule métallique de 10/10 mm de diamètre; de même une canule de 13/10mm est fixée dans le tronc abdominal de la veine cave inférieure, entre l'insertion des trois veines sushépatiques et l'abouchement de la veine rénale droite. Le foie est isolé, pesé, et l'on perfuse immédiatement par la veine porte en s'aidant d'une seringue , 10 à 15 ml de solution de LOCKE-RINGER afin d'éviter que les canules ne soient obstruées par la coagulation du sang.

L'organe ainsi préparé est suspendu dans l'appareil à per-

fusions de Palmer par la canule portale qui sert de voie d'introduction au liquide de perfusion, tandis que le liquide perfusé s'écoulera par la canule reliée à la veine cave inférieure; celle-ci doit être maintenue presque horizontalement pour faciliter la sortie du liquide perfusé et éviter qu'il ne s'écoule le long du foie. L'ensemble est placé dans un manchon de verre cylindrique dont la partie inférieure se termine en entonnoir. Ce manchon permet de maintenir autour de l'organe une atmosphère suffisamment humide et chauffée à 37º 38º par le rayonnement d'une ampoule électrique de 100 watts placée à 15 ou 20 cm du manchon.

Perfusions et dosages :

La formule de la solution de LOCKE-RINGER que nous avons utilisée est la suivante :

- Chlorure de sodium	9,80g	Bicarbonate de sodium	0,15g
- Chlorure de potassium	0,42g	Glucose	1,00g
- Chlorure de calcium crist.	0,24g	Eau distillée : q.s.p.	1.000 ml

Immédiatement avant son utilisation, cette solution est additionnée d'adiphénine à la dose de 0,5 g par litre. Elle est oxygénée pendant toute la durée de la perfusion et portée à 38º au moment de son introduction dans l'organe.

La pression du liquide de perfusion, maintenue constante grâce à l'emploi d'un vase de Mariotte, est, à l'entrée de la veine porte, de 18 à 20mm de mercure. Le débit du liquide à travers l'organe est en moyenne de 3,3ml par minute. Il est recueilli à la sortie de l'entonnoir terminant le manchon de verre dans une série d'éprouvettes graduées.

La teneur en adiphénine des différentes fractions, récoltées toutes les six minutes pendant la première demi-heure, puis toutes les dix minutes pendant la deuxième, est déterminée par la méthode colorimétrique après défécation alcoolotartrique.

En une heure le volume total du liquide perfusé est voisin de 200 ml ce qui correspond à 100 mg d'adiphénine.

Résultats (1) et (2)

Les résultats obtenus (tableau № 20) montrent que la vitesse de destruction de l'adiphénine est sensiblement constante pendant toute la durée de l'expérience. De plus les variations d'activité des différents foies sont peu importantes si l'on rapporte cette activité à l'unité de masse de l'organe.

Cependant ces résultats, bien que très homogènes, diffèrent beaucoup en grandeur de ceux que nous avions trouvés lors de l'étude de la destruction de l'adiphénine par les homogénats de foie de Cobaye. Rapportée au même poids d'organe, l'activité enzymatique de l'homogénat est bien plus élevée que celle de l'organe intact. On peut calculer qu'elle est environ 27 fois plus grande. Cette différence peut être expliquée par le fait que, dans l'organe perfusé, l'adiphénine n'arrive que lentement au contact de l'enzyme par suite de la nécessité de traverser les parois cellulaires. Au contraire dans les essais réalisés in vitro, l'enzyme cytoplasmique est mis directement et immédiatement en contact avec le substrat.

Nous avons vérifié en outre que la disparition de l'adiphénine dans le liquide de perfusion est bien due à sa destruction et non pas à sa fixation par le foie : des recherches du toxique dans 1g d'organe prélevé immédiatement après la perfusion, se sont toujours révélées négatives.

---

(1)- L'hydrolyse spontanée de l'adiphénine dans la solution de Locke-Ringer est négligeable (elle est inférieure à 3 p.100 à la fin de la perfusion) et nous n'en avons pas tenu compte dans la présentation des résultats.

(2)- Des essais préliminaires dont les résultats ne figurent pas dans ce tableau, nous ont permis de constater que les quantités d'adiphénine détruites au cours de la perfusion sont indépendantes de la concentration de l'adiphénine, tout au moins quand cette concentration varie du simple au double. Nous avons finalement fixé cette dernière à 500 μg/ml en ayant uniquement le souci d'accroître la précision des résultats (taux d'hydrolyse voisin de 50 p. 100).

TABLEAU Nº 20

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE
AU COURS DE PERFUSIONS DE FOIES ISOLES DE COBAYES

Liquide de perfusion : solution d'adiphénine à 0,5 p. 1000 ($1,4.10^{-3}$M) dans la solution de Locke-Ringer.
Vitesse d'écoulement du liquide perfusé : 10ml par 3 minutes.

Numéro de l'animal	I	II	III	IV	V	VI
Poids du foie en g	17,5	24	19	19,5	13,5	18,5
Heure de prélèvements	Pourcentage d'hydrolyse pour chaque prélèvement					
6 min.	59	66	80	61	36	36
12 min.	32	72		76	45	53
18 min.	59	75	86	75		
24 min.	60	75	82	75	48	68
30 min.	59	74	82	78	53	61
40 min.	61	75	75	84	51	67
50 min.	61	76	86	85	53	69
60 min.	62	75	86		53	
Moyenne	56,5	73,5	82,5	76,5	48,5	59,5
Adiphénine détruite par minute : en µg	940	1.220	1.370	1.270	810	990
Adiphénine détruite par g de foie et par minute : en µg	54	51	72	65	60	53
	moyenne des résultats : 60					

B - Perfusions de reins.

Dans ces expériences, le liquide de perfusion parvient par l'intermédiaire de l'aorte dans les deux reins de l'animal et les irrigue simultanément; il s'écoule ensuite librement par les vaisseaux veineux (ceci permet de simplifier les opérations de prélèvement et d'en réduire au minimum la durée). Les voies d'excrétion rénales sont ligaturées afin de ne recueillir que le liquide provenant du système sanguin.

Prélèvement et montage de l'organe.

L'animal est sacrifié par saignée et on élimine de la cavité abdominale toute la masse viscérale, de manière à mettre à découvert le système rénal. L'aorte est dégagée sur la plus grande partie possible de son trajet thoracique et abdominal, et est ligaturée puis sectionnée en-dessous de l'abouchement des artères rénales. On lie et sectionne également chacun des deux uretères. On introduit alors dans le tronçon thoracique de l'aorte, une canule de 10/10ème de mm de diamètre dont on fixe l'extrémité à un niveau situé entre le tronc coeliaque et les abouchements des artères rénales et surrénales. Enfin les deux reins sont isolés de l'animal et l'on met la canule en connection avec l'appareil à perfusions de Palmer.

Perfusions et dosages -

Ceux-ci sont conduits dans des conditions très voisines de celles que nous avons décrites pour la perfusion du foie isolé.

Seules en diffèrent :

a)- la concentration de l'adiphénine dans la solution de Locke-Ringer que nous avons été amenés à fixer à 250 µg/ml (2) (page 74);

b)- la pression du liquide à l'entrée de l'organe : celle-ci doit s'élever de 25mm de Hg à 40mm de Hg suivant les expériences, afin de permettre une vitesse d'écoulement du liquide perfusé de 3,3ml par minute.

Les durées des perfusions ont été limitées à 30 minutes. Pour des temps plus longs, il apparaît un oedème important qui fausse les déterminations de l'activité enzymatique. Notons d'ailleurs que cette cause d'erreur n'est pas totalement éliminée puisque, déjà après 15 minutes de perfusion, la pression initiale doit être augmentée si l'on veut maintenir le débit constant.

Les quantités d'adiphénine perfusées en 30 minutes sont voisines de 25 mg .

Résultats :

Des résultats trouvés (voir tableau № 21), nous pouvons déduire que la vitesse de destruction de l'adiphénine diminue progressivement au fur et à mesure de la perfusion. Par contre, on ne trouve que peu de variations de l'activité enzymatique lorsque l'on passe de l'organe d'un animal à celui d'un autre.

Rapportée à l'unité de poids de tissus, la vitesse de la destruction de l'adiphénine est plus grande dans le cas de l'homogénat que dans le cas de l'organe perfusé, comme nous l'avons déjà constaté pour le foie. Mais ici le rapport des activités n'est que de 1 à 9. Et contrairement à ce qui a été trouvé pour los homogénats (tableau № 4 p.39) le rein perfusé paraît avoir une activité enzymatique plus élevée que celle du foie soumis aux mêmes conditions (1 g de ces organes perfusés détruisent respectivement 87 μg et 60 μg d'adiphénine en 1 minute). Ces constatations tendraient à montrer ici encore, en se référant à la riche vascularisation capillaire du rein, que la perméabilité cellulaire est le facteur limitant de la destruction de l'adiphénine.

Quoiqu'il en soit, nous devons remarquer que les résultats obtenus par ces deux séries d'expériences ne paraissent guère refléter l'intensité du phénomène de détoxication tel qu'il doit se produire au sein de l'organisme vivant : (les très petites quantités de spasmolytique retrouvées chez l'animal après l'administration de doses rapidement mortelles (Chapitre VI, p . 83) nous laissent prévoir une

détoxication très rapide).

Malgré toutes les précautions prises pour ces perfusions, les causes d'erreurs n'en restent pas moins nombreuses : citons, par exemple, l'utilisation d'un liquide de perfusion synthétique puisqu'il n'est pas possible d'employer le sang de l'animal.

Mais ces recherches auront eu au moins le mérite de nous montrer avec quelle prudence doivent être interprétés les résultats obtenus in vitro, puisqu'il n'est pas toujours possible de les transposer à l'animal entier. Divers facteurs négligés dans les premières études, peuvent modifier profondément le problème "in animal vili".

TABLEAU Nº 21

DESTRUCTION DE L'ADIPHENINE AU COURS DE PERFUSIONS DE REINS ISOLES DE COBAYES

Liquide de perfusion : solution d'adiphénine à 0,25 p.1000 ($7,2.10^{-4}$M) dans la solution de Locke-Ringer.
Vitesse d'écoulement du liquide perfusé : 10 ml par 3 minutes.

Numéro de l'animal	I	II	III	IV
Poids des reins en g	3,9	3,2	3,4	2,6
Heure de prélèvements	Pourcentage d'hydrolyse pour chaque prélèvement			
3 min.	56	38	48	26
6 min.	55	37	44	25
9 min.	55	34	42	24
12 min.	47	31	42	24
15 min.	38	34	40	12
18 min.	38	27	44	23
24 min.	36	28	35	21
30 min.	32	25	36	21
Moyenne	44,5	32	41	22
Adiphénine détruite par minute : en µg	370	266	342	183
Adiphénine détruite par g. de rein et par minute, en µg	95	83	100	70
	Moyenne des résultats : 87			

CHAPITRE V

RECHERCHES SUR LA FORMATION D'ENZYMES D'ADAPTATION

Les différences d'activité enzymatique d'un même organe suivant l'espèce considérée, et pour une même espèce, suivant les individus ou le mode de vie de l'animal (cas des lapins de clapier et des lapins de garenne) posent le problème de la formation d'enzymes d'adaptation.

On sait que chez les microorganismes il est assez facile de créer de tels enzymes et l'on connaît les conséquences pratiques que peuvent avoir leur apparition : citons, par exemple, la formation des pénicillinases chez les staphylocoques qui conduit à modifier la thérapeutique prescrite.

S'il semble plus difficile de faire apparaître des enzymes nouveaux dans les organes des animaux supérieurs, il est possible parfois d'accroître leur activité enzymatique lorsqu'ils en sont pourvus : ainsi HECKEL [54] remarquait-il déjà que des animaux sensibles à l'ingestion de belladone (lapins, cobayes et rats) pouvaient être rapidement accoutumés à un régime composé exclusivement de feuilles ou de racines de cette solanacée. De même FISHMAN [30] montre que la teneur en glucuronidase des organes de Chien augmente au cours de l'intoxication par le bornéol. GLASSON [33] explique également le pouvoir aspirinesterasique anormalement élevé de certains sérums humains par un traitement préalable à l'aspirine ou à d'autres dérivés acétylés.

Nous avons cherché s'il en serait de même chez des cobayes traités par des doses faibles, mais répétées de l'un de nos toxiques : l'hexahydroadiphénine; cet ester fut choisi en raison de sa résistance relativement élevée à l'esterase du Cobaye, ainsi que de la grande stabilité de ses solutions aqueuses.

Un lot de huit animaux mâles fut régulièrement traité par des injections sous-cutanées tri-hebdomadaires d'hexahydro-adiphénine à la dose de 1,5mg/kg.(Des quantités de toxique supérieures ou simplementplus fréquemment administrées amènent rapidement la mort de l'animal). Nous avons fait durer ce traitement pendant cinq mois, cependant que deux animaux témoins étaient soumis au même régime alimentaire que les autres. Au bout de ce temps, trois seulement des huit animaux intoxiqués survivaient. Ceux-ci ainsi que les deux témoins, furent alors sacrifiés par saignée et nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir enzymatique de leursfoie, rein et sang vis-à-vis de l'hexahydroadiphénine, en opérant comme à l'accoutumée, sur des homogénats de ces organes.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau N° 22. Il en ressort que les tissus des animaux traités détruisent l'hexahydroadiphénine avec des vitesses très voisines de celles que l'on observe pour les témoins. Elles leur sont cependant très légèrement inférieures, mais ces différences peuvent être attribuées aux seules variations individuelles.

Ainsi l'intoxication chronique des animaux n'augmente point leur capacité de défense à l'égard de cet ester du diéthylaminoéthanol.

TABLEAU Nº 22

DESTRUCTION DE L'HEXAHYDRO-ADIPHENINE PAR QUELQUES ORGANES DE COBAYES MITHRIDATISES

Technique colorimétrique : Température : 37º : pH : 7,2

Réactifs		Concentrations finales
a) Organe homogénéisé dans (c)	0,25 dans 1ml	25 p.1.000
ou sérum	5ml	500 p.1.000
b) solution d'hexahydroadiphénine dans (c) à 0,5 mg/ml	5 ml	0,25 p.1000 = 7,2 10^{-4}M
c) solution tampon phosphatée : M/15 à pH 7,2	q.s.p. 10ml	

Nature de l'organe	Temps en minutes	Animaux mithridatisés			Témoins	
		I	II	III	I	II
		Pourcentage d'hydrolyse				
Foie	30	18	16	19	22	26
	60	22	26	38	15	50
Rein	30	6	0	7	5	0
	60	8	12	7	7	4
Sang	30	0	16	22	19	38
	60	0	48	26	50	56

CHAPITRE VI

REPARTITION DES SPASMOLYTIQUES A LA SUITE D'INTOXICATIONS EXPERIMENTALES

Nous avons montré dans un précédent chapître que certains organes possèdent in vitro un pouvoir de destruction très marqué de l'adiphénine et des esters voisins, cependant que d'autres organes ont une activité enzymatique très faible ou nulle.

La recherche de la répartition des spasmolytiques poursuivie sur un organisme vivant intoxiqué, nous a permis de vérifier que les activités enzymatiques in vivo des organes étaient parallèles aux activités observées in vitro .

Ainsi peut être défini le degré d'action de chaque organe au cours de la détoxication.

De plus, si la transposition de ces observations de l'animal à l'homme peut être vérifiée, cette connaissance pourrait être utile à l'expert chargé du dépistage des intoxications et lui indiquerait dans quel organe il aurait le plus de chances de retrouver le toxique.

Tous nos essais ont porté sur le Cobaye. Les animaux reçoivent par voie intra-péritonéale des doses submortelles ou rapidement mortelles de produit et sont sacrifiés par saignée au bout de temps variables, généralement peu après l'apparition des convulsions qui précèdent la mort. Les organes sont prélevés immédiatement puis refroidis à -5º. Les dosages se font par la technique colorimétrique habituelle sur 1 gramme de purée d'organe (1) mis au contact de 10 ml

(1)- En raison de la sensibilité de la méthode colorimétrique utilisée il est inutile d'opérer sur une prise d'essai plus élevée, qui nécessiterait une augmentation du volume du solvant et, par suite, sa concentration ultérieure. Or, celle-ci, telle qu'elle est pratiquée dans la méthode générale de Stass-Otto, entraîne l'hydrolyse d'une partie non négligeable du toxique.

d'alcool tartrique pendant 15 minutes, l'expérience a montré que ce temps est suffisant pour l'extraction totale du toxique.

Parallèlement à ces dosages, nous avons déterminé l'activité hydrolysante du sang de l'animal pour le toxique utilisé.

1º- Répartition de l'adiphénine.

Comme l'indiquent les résultats consignés dans le tableau Nº 23, les quantités d'adiphénine retrouvées sont, au total, très faibles malgré les fortes doses de toxique administrées et le court délai de survie de l'animal.

Les valeurs trouvées correspondent bien à ce que l'on pouvait prévoir pour les organes très riches en diastases. Pour les tissus dont l'activité enzymatique est faible ou nulle, elles témoignent de leur affinité plus ou moins grande pour le toxique.

Ainsi, il n'est retrouvé dans le cerveau et le muscle que très peu ou pas du tout d'adiphénine et l'on peut en déduire que ces tissus ne fixent pas ce produit. Par contre son tropisme est plus élevé pour le coeur, et surtout, pour le poumon qui recèle les plus fortes proportions de l'adiphénine retrouvée.

Le foie, le rein et le sang défibriné ne contiannent que de faibles quantités de l'ester administré. Ceci ne prouve point qu'il ne se fixe pas sur les tissus à activité hydrolysante intense. Au contraire, le fait que seule une faible proportion de la quantité administrée a été retrouvée dans les autres organes, tendrait à prouver que ce médicament s'y concentre et qu'il y est rapidement détruit.

Afin de préciser ce point, nous avons répété nos essais en utilisant l'hexahydroadiphénine dont l'hydrolyse enzymatique in vitro est beaucoup moins rapide que celle de l'adiphénine.

2º- Répartition de l'hexahydroadiphénine.

Les résultats trouvés au cours de ces essais (voir tableau Nº 24) sont conformes à notre hypothèse. Le cerveau ne fixe toujours

qu'une faible quantité de toxique, le coeur en recèle une quantité un peu plus importante, et parmi les organes à activité diastasique faible ou nulle, c'est encore le poumon qui en contient le plus. Mais nous remarquons que l'affinité pour le foie apparaît très nettement ici, surtout pour l'animal № I (dose de produit injecté très grande, temps de contact court). Par contre le rein ne fixe que des quantités très faibles de produit et il est curieux de constater que l'on ne retrouve dans le sang que très peu ou pas du tout d'hexahydroadiphénine, même peu de temps après l'introduction d'une forte dose de médicament.

Nous en déduisons que le toxique est fixé très rapidement par le foie de l'animal pour y être aussitôt détruit, s'il est très sensible à l'esterase hépatique (cas de l'adiphénine), ou bien, plus lentement hydrolysé, s'il est plus résistant, ce que nous constatons avec l'hexahydroadiphénine.

3º- Répartition du propivane et du chlorure de diméthylcaramiphène.

Pour compléter cette partie de notre travail nous avons fait quelques essais en utilisant le propivane et le chlorure de diméthylcaramiphène. Les résultats trouvés, rapportés dans le tableau № 25 amènent des conclusions identiques à celles que nous avons formulées pour les autres toxiques.

Ajoutons que DELGA et ANDRIEU [22] , en étudiant la répartition du chlorure de caramiphène chez le Lapin, ne retrouvaient que des quantités très minimes de cet ester "dans les organes possédant une activité enzymatique intense : foie, rein, sang" et remarquaient aussi " la fixation importante du toxique au niveau du poumon".

Nous pouvons donc en conclure que tous les spasmolytiques étudiés se répartissent d'une façon analogue dans les organes de l'animal intoxiqué.

Quelques remarques s'appliquent à l'ensemble de ces essais :

a)- Les quantités de toxique contenues dans les organes diminuent rapidement avec le temps, même quand ces organes ont une acti-

TABLEAU Nº 23

LOCALISATION DE L'ADIPHENINE
APRES INJECTION INTRAPERITONEALE CHEZ LE COBAYE

	I		II		III		IV	
Quantité de produit injecté	mg/kg	par animal	mg/kg	par animal	mg/kg	par animal	mg/kg	par animal
	400	120	400	200	400	210	200	88
Temps au bout duquel l'animal a été sacrifié	4 minutes		5 minutes		20 minutes		30 minutes	
	Quantité de produit retrouvé en µg							
	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe	parg	par organe
Coeur	100	170	130	195	50	75	145	210
Cerveau	20	52	10	29	0	0	traces	
Rein	10	35	0	0	0	0	0	0
Poumon	500	1.600	370	1.370	70	245	65	218
Foie	0	0	0	0	0	0	145	2.100
Sang défibriné	20		0		10		20	
Muscle	0		traces		0		0	

Temps	Pourcentage d'hydrolyse de 500 µg d'adiphénine par 1 ml de sang défibriné (mêmes animaux)			
5 minutes		34	38	40
10 minutes		50	60	70
20 minutes		85	88	90
30 minutes		100	100	95

TABLEAU Nº 24

LOCALISATION DE L'HEXAHYDROADIPHENINE APRES INJECTION INTRAPERITONEALE CHEZ LE COBAYE

	I		II		III		IV		V		VI	
Quantité de produit injecté	mg/kg 800	mg/ani. 300	mg/kg 800	mg/ani. 240	mg/kg 400	mg/ani. 195	mg/kg 200	mg/ani. 90	mg/kg 200	mg/ani. 100	mg/kg 200	mg/ani. 100
Temps au bout duquel l'animal a été sacrifié	15 min.		45 min.		30 min.		30 min.		30 min.		30 min.	
	Quantité de produit retrouvé en µg.											
	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe
Coeur	70	98	60	96	20	36	90	144	90	153	75	127
Cerveau	30	111	50	145	0	0	20	70	90	288	40	128
Rein	90	378	75	262	0	0	25	92	80	315	40	156
Poumon	800	2960	500	1600	90	306	50	230	190	1140	230	1035
Foie	950	13822	150	2250	0	0	20	332	130	2860	50	1025
Sang défibriné	0		50		0		25		0		40	
Temps	Pourcentage d'hydrolyse de 500 µg d'hexahydroadiphénine par 1 ml de sang défibriné (mêmes animaux)											
30 min.			36		44		32		36		40	
60 min.			52		64		44		58		64	
180 min.			68		70				67		70	

TABLEAU Nº 25

LOCALISATION DU PROPIVANE ET DU CHLORURE DE DIMETHYLCARAMIPHENE
APRES INJECTION INTRAPERITONEALE CHEZ LE COBAYE

Nature du produit	Propivane				Chlorure de Diméthylcaramiphène			
	I		II		I		II	
Quantité de produit injecté	mg/kg 400	mg/animal 140	mg/kg 200	mg/animal 75	mg/kg 400	mg/animal 150	mg/kg 400	mg/animal 170
Temps au bout duquel l'animal a été sacrifié	5 minutes		30 minutes		30 minutes		30 minutes	
	Quantité de produit retrouvé en µg							
	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe	par g	par organe
Coeur	100	140	traces	traces	50	70	30	42
Cerveau	20	60	0	0	30	90	0	0
Rein	0	0	0	0	0	0	0	0
Poumon	180	470	70	175	160	420	30	99
Foie	0	0	0	0	150	2115	traces	
Sang défibriné	20		50		traces		0	
Muscle	0		0		0			
Temps	Pourcentage d'hydrolyse de 500 µg d'ester par 1 ml de sang défibriné (mêmes animaux)							
15 Minutes	30		42					
30 Minutes			76		36		40	
60 Minutes			95		56		58	
120 Minutes					80		88	

vité enzymatique très faible.

b)- On peut penser , que si le toxique se fixe sur des organes enzymatiquement inactifs, il peut être transporté peu à peu par le sang vers les organes capables de le détruire et finalement disparaît complètement.

c)- Pour des essais de même durée, portant sur des animaux ayant reçu la même dose de toxique, les quantités fixées par les organes des différents animaux ne semblent pas être en rapport avec l'activité diastasique de leur sang (celle-ci est peu différente d'un animal à l'autre).

d)- Enfin, nous noterons que le foie très riche en esterase joue un rôle de tout premier plan dans le mécanisme de la détoxication des esters du diéthylaminoéthanol chez l'animal vivant, tandis que le sang et les reins, dont le pouvoir enzymatique in vitro est souvent très grand, ne semblent participer qu'à un degré moindre à la transformation métabolique de ces produits.

QUATRIEME PARTIE

CARACTERISTIQUES de l'ENZYME

Dans cette partie, nous avons déterminé les principales propriétés de l'enzyme, dans le but de l'identifier et de le différencier des diastases agissant sur des substrats voisins.

Nous étudierons successivement :

1º- Les influences respectives de la concentration en enzyme et en substrat sur la vitesse d'hydrolyse ainsi que la valeur de la constante de dissociation du complexe enzyme-adiphénine.

2º- L'influence des conditions du milieu : pH, température, substances dialysables.

3º- L'action des principaux inhibiteurs connus.

CHAPITRE I

RAPPORT ENZYME-SUBSTRAT

DETERMINATION de la CONSTANTE de DISSOCIATION

Depuis les travaux de MICHAELIS et MENTEN [79] il est généralement admis qu'une réaction catalysée par un enzyme résulte d'un ensemble de deux réactions :

A - Combinaison réversible de l'enzyme E et du substrat S :

$$E + S \rightleftharpoons ES \qquad (a)$$

B - Décomposition irréversible du complexe enzyme-substrat qui conduit aux produits finaux de la réaction en régénérant l'enzyme :

$$ES = E + S' \qquad (b)$$

Pour justifier cette hypothèse MICHAELIS et MENTEN (1) ont en effet démontré que la vitesse de la réaction enzymatique était proportionnelle à la concentration du complexe enzyme-substrat et qu'il était donc possible de caractériser l'action d'un enzyme sur un substrat donné à l'aide de deux constantes :

1 - La constante de dissociation K_s du complexe enzyme-substrat (constante de MICHAELIS) qui est l'inverse de la constante d'équilibre de GULDBERG et WAAGE calculée pour l'équation (a). Le rapport $\frac{1}{K_s}$ représente également " l'affinité" de l'enzyme pour le substrat.

2 - Une constante de proportionnalité (2).

Nous avons recherché la valeur de la constante de dissociation que l'on peut définir comme étant la concentration moléculaire en substrat correspondant à la moitié de la vitesse maximum d'hydrolyse. Cette vitesse maximum est la vitesse initiale de la réaction pour la plus basse concentration en substrat avec laquelle l'enzyme réagit avec la plus grande vitesse. MICHAELIS et MENTEN ont montré que la constante de dissociation était indépendante de la concentration en enzyme. Mais pour des raisons d'ordre expérimental, il est nécessaire d'opérer avec une concentration de l'enzyme telle que les mesures puissent être effectuées avec la meilleure précision possible. Il importe également de préciser le temps de contact de l'enzyme et du substrat; celui-ci doit être suffisamment grand pour que l'on puisse mesurer une hydrolyse élevée sans toutefois atteindre le moment où la vitesse se ralentit par manque de substrat à décomposer.

Ces deux déterminations font l'objet des essais ci-dessous

I. Influence de la concentration en enzyme.

L'hydrolyse de l'adiphénine à concentration constante et suf-

---

(1)- C'est en réalité à V. HENRI (Thèse Paris,1903) que l'on doit l'expression quantitative de la vitesse en fonction des constantes d'"association" de l'enzyme avec le substrat.

(2)- Cette constante de proportionnalité est désignée dans les récents travaux d'ARIENS [3] sous le nom d' "activité intrinsèque" du substrat.

fisamment élevée : 2,8. 10^{-3}M, par des doses croissantes de poudre acétonique de foies de cobayes (à des concentrations allant de 1 à 10 p. 1.000) a été suivie manométriquement dans l'appareil de Warburg pendant 60 minutes à 37º et à pH 7,9.

Les quantités d'adiphénine décomposées (nombre de μl de gaz carbonique dégagée) en fonction du temps et de la concentration en enzyme, sont représentées par la famille de courbes de la figure V; les valeurs numériques en sont données dans le tableau № 26.

L'examen de ces résultats montre que, quelle que soit la concentration en enzyme, la vitesse de décomposition de l'adiphénine est constante pendant un temps au moins égal à 20 minutes. C'est donc ce temps que nous avons choisi pour les essais ultérieurs.

D'autre part, si pour ce temps de 20 minutes, nous construisons la courbe des activités en fonction de la concentration en enzyme (Fig. VI), nous voyons que bien que l'on n'observe pas de variations brusques susceptibles de fausser grossièrement les déterminations, les quantités d'adiphénine détruite n'augmentent pas toujours proportionnellement aux concentrations de l'enzyme (1). Ce n'est que pour les faibles concentrations en enzyme que l'on peut admettre la proportionnalité. Ceci nous a conduit à utiliser pour les déterminations suivantes une concentration en poudre de foie de Cobaye de 4 p. 1000.

II.- Influence de la concentration en substrat - Constante de dissociation.

A - Résultats expérimentaux.

De la même manière que précédemment, nous avons mesuré pendant 30 minutes la décomposition de doses croissantes d'adiphénine (à des concentrations allant de 0,4 à 10 p. 1000) par une même quantité d'enzyme (suspension de poudre acétonique de foies de cobayes de concentration finale égale à 4 p. 1000)

(1)- Des résultats analogues ont d'ailleurs été trouvés lors de l'étude de la destruction de l'adiphénine par des quantités croissantes de sérum de lapin :(voir page 42 , tableau № 7.)

TABLEAU Nº 26

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME

Technique manométrique : température : 37º ; pH : 7,9;

Réactifs		Concentration finale.
a) suspension de poudre de foie de Cobaye dans (c)	1 ml	
b) solution d'adiphénine à 5 p. 1000 dans (c)	0,5ml	1 p.1000=2,87.10^{-3}M
c) solution de Ringer bicarbonatée	1 ml	

Temps en minutes	5	10	15	20	30	40	50	60
Concentrations finales en poudre de foie de Cobaye	Activités exprimées en µl de CO_2 dégagés							
10 p.1.000	25	48	69	90	110	120	120	120
7,5 -	21	40	56	75	97	116	116	116
4 -	12	22	32	44	64	82	95	95
2 -	8	12	18	25	35	45	54	64
1 -	4	5	5	9	14	19	22	27
0,4 -		2		4,5	7	10	12,5	14

FIGURE V

DESTRUCTION EN FONCTION DU TEMPS DE DOSES CONSTANTES D'ADIPHENINE PAR DES QUANTITES CROISSANTES DE POUDRE DE FOIE DE COBAYE

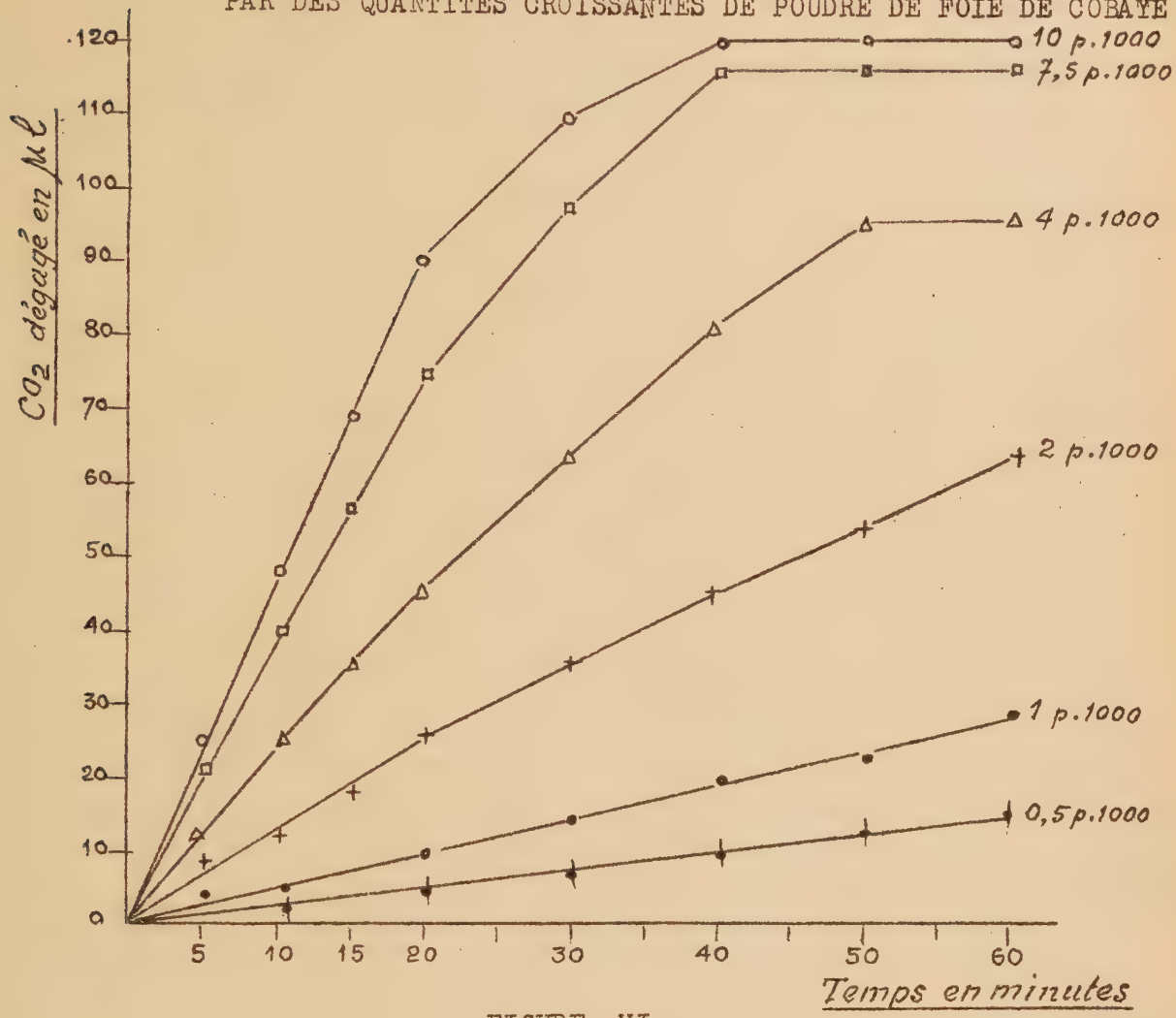
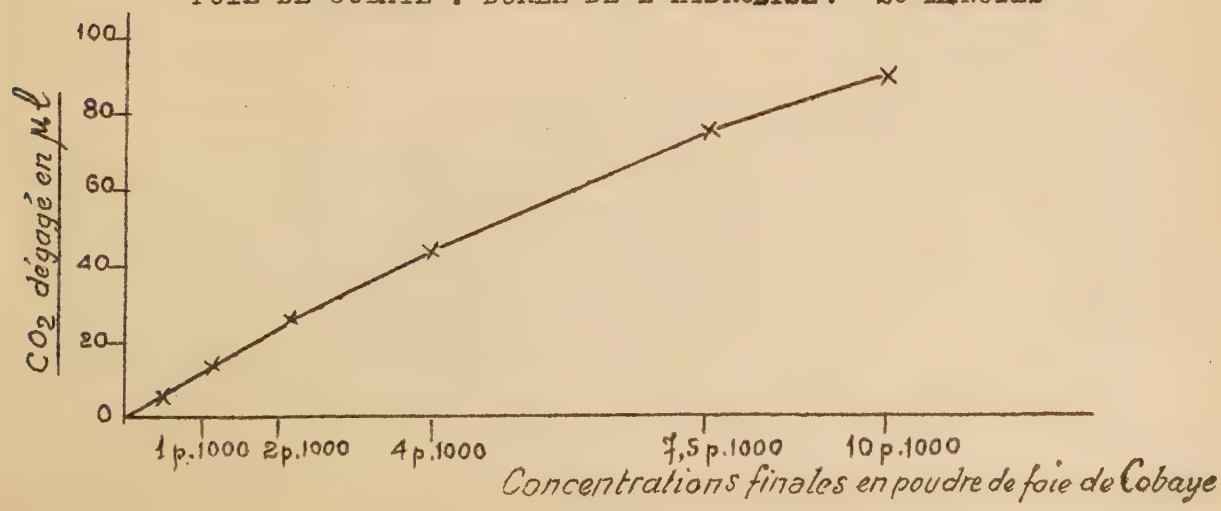


FIGURE VI

ACTIVITES ENZYMATIQUES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN POUDRE DE FOIE DE COBAYE : DUREE DE L'HYDROLYSE : 20 MINUTES



Les résultats de ces expériences sont condensés ; dans le tableau № 27 et représentés par les courbes de la figure VII.

A partir de ces résultats, nous avons construit la courbe des activités enzymatiques en fonction du cologarithme de la concentration en adiphénine pour un temps de contact entre l'enzyme et le substrat que nous avons choisi ici encore, égal à 20 minutes : courbe I, figure VIII. La courbe est tracée sur un papier semi-logarithmique : en ordonnée figurent les vitesses initiales de chacune des réactions, correspondant soit aux valeurs réelles des volumes de gaz carbonique dégagés en 20 minutes, soit aux valeurs extrapolées des dégagements initiaux pour les faibles concentrations en substrat; en abscisse sont portées les valeurs de concentrations moléculaires du substrat.

Le tracé montre un aplatissement vers un palier qui représente la vitesse maximum de la réaction enzymatique pour les plus fortes concentrations en substrat. Mais nous n'avons pu poursuivre les déterminations pour des valeurs de la concentration en adiphénine supérieures à 2,87. 10^{-3}M parce que nos expériences étaient alors entachées de trop fortes erreurs dues à l'hydrolyse chimique de l'adiphénine; et, de ce fait, la valeur de la vitesse maximum de la réaction n'est qu'approximative.

Elle nous permet cependant de déterminer graphiquement une valeur approchée de la constante de dissociation; la concentration de l'adiphénine à laquelle l'enzyme réagit avec une vitesse égale à la moitié de sa vitesse maximum est, d'après la courbe, voisine de $1,5 \times 10^{-4} = K_s$.

La théorie de MICHAELIS permet de vérifier cette valeur par l'établissement des courbes théoriques des activités en fonction du cologarithme de la concentration en substrat, calculées pour différentes valeurs de K_s. La courbe théorique se rapprochant le plus des points trouvés expérimentalement correspond à la valeur exacte de la constante de dissociation.

TABLEAU Nº 27

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADIPHENINE

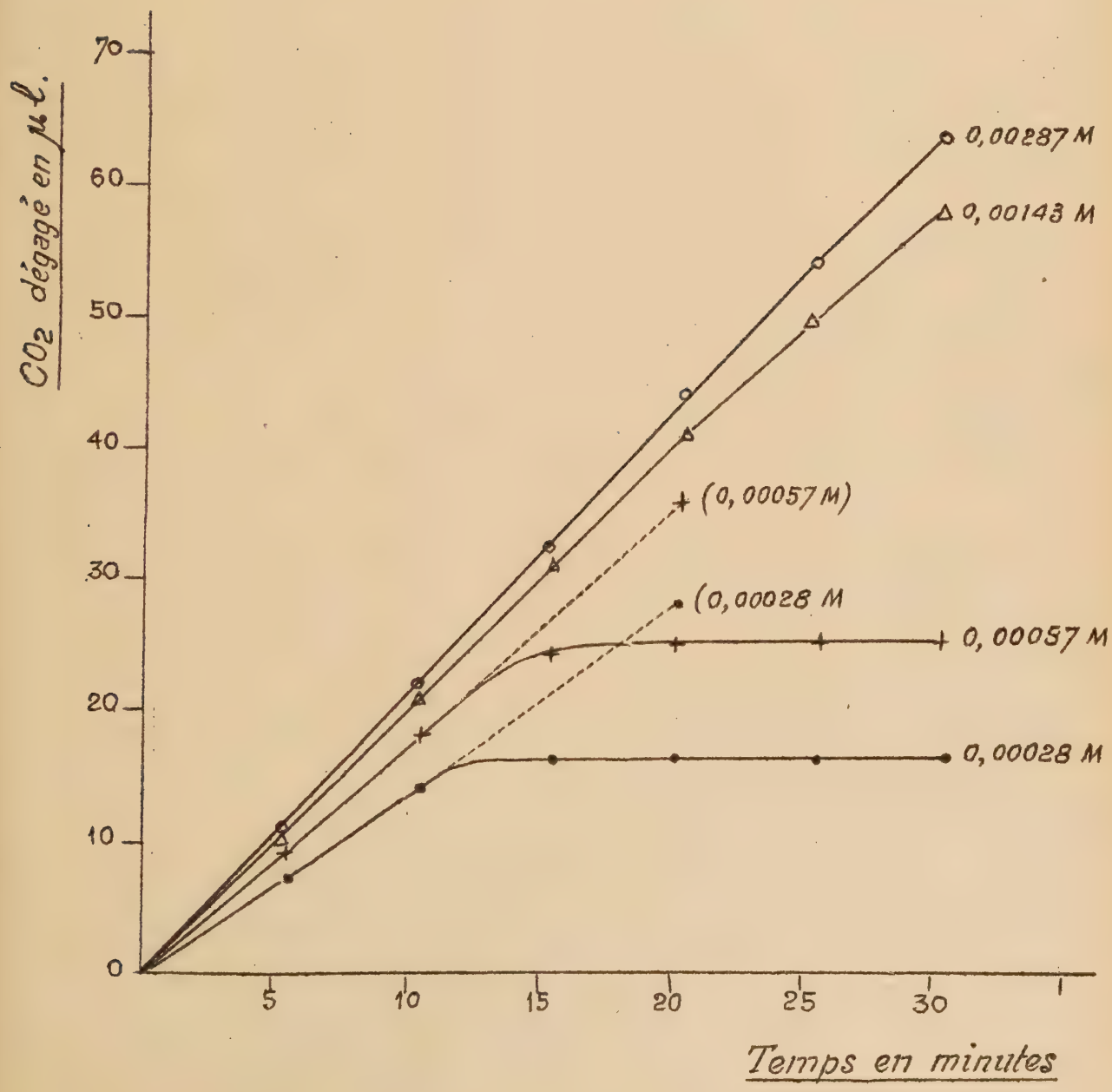
Technique manométrique : température : 37º; pH : 7,9;

Réactifs		Concentration finale
a) suspension de poudre de foie de Cobaye à 10 p.1000 dans (c)	1 ml	4 p.1000
b) solution d'adiphénine dans (c) de concentration variable	0,5 ml	
c) solution de Ringer bicarbonatée	1 ml	

Temps en minutes	5	10	15	20	25	30
Concentrations finales en adiphénine	Activités exprimées en µl de CO_2 dégagés					
1 o/oo = 00287 M	11	22	32	44	54	64
0,5 o/oo = 0,00143 M	9,5	22	31	41	49,5	57,5
0,2 o/oo = 0,00057 M	9	18	24	25	25	25
0,1 o/oo = 0,00028 M	7	14	16	16	16	16

FIGURE VII

DESTRUCTION EN FONCTION DU TEMPS DE DOSES CROISSANTES D'ADIPHENINE PAR DES QUANTITES CONSTANTES DE POUDRE DE FOIE DE COBAYE



B - Etablissement de la courbe théorique.

D'après MICHAELIS, les vitesses d'hydrolyse pour des concentrations variables en substrat $m_1 \ldots m_2 \ldots$, etc., subissent les mêmes variations que les valeurs du terme $\frac{m}{m + K_s} = \rho$, ce terme représente la fraction de l'enzyme combinée avec le substrat, K_s étant la constante de dissociation du complexe. Si l'on construit des courbes telles que 100 ρ calculés = $\frac{100 \times m}{m + K_s}$, en donnant à la vitesse maximum de la réaction la valeur 1 correspondant à 100 p. 100 de l'enzyme combiné au substrat, pour différentes valeurs rapprochées de K_s, il sera possible de placer sur l'une d'elles les points expérimentaux correspondant aux valeurs des vitesses relatives $V_1 \ldots V_2 \ldots$ etc..., multipliées par le facteur caractéristique c dans le but d'obtenir le pourcentage de l'enzyme combiné (100 ρ observés = c x v). Les valeurs de K_s et de c sont donc choisies pour atteindre une courbe d'activité théorique se rapprochant au maximum des points expérimentaux.

Nous avons rassemblé dans le tableau № 28 les données relatives au calcul de la constante de dissociation du complexe adiphénine-esterase du foie de Cobaye.

L'accord entre la courbe théorique pour une valeur de $K_s = 1,5.10^{-4}$ et les points obtenus expérimentalement (courbe II, figure VIII) est satisfaisant.

Cette valeur de la constante de dissociation $K_s = 1,5.10^{-4}$ indique une très grande affinité entre l'adiphénine et l'esterase du foie de Cobaye. Citons par comparaison les valeurs suivantes :

- K_s : acétylcholine-esterase du sérum humain = $1,1.10^{-3}$ (GLICK) [34]) et $2,75.10^{-3}$ (LEVY [68]).
- K_s : atropine-esterase du sérum de Lapin = 6.10^{-5} (GLICK [35]) et $7,8.10^{-4}$ (LEVY [69]).
- K_s : butyrate de méthyl-esterase du foie de Porc = 2.10^{-3} (SOBOTKA et GLICK [89]).

TABLEAU Nº 28

DONNEES NUMERIQUES RELATIVES AUX CALCULS DE LA CONSTANTE DE DISSOCIATION

Facteur c = 2,2

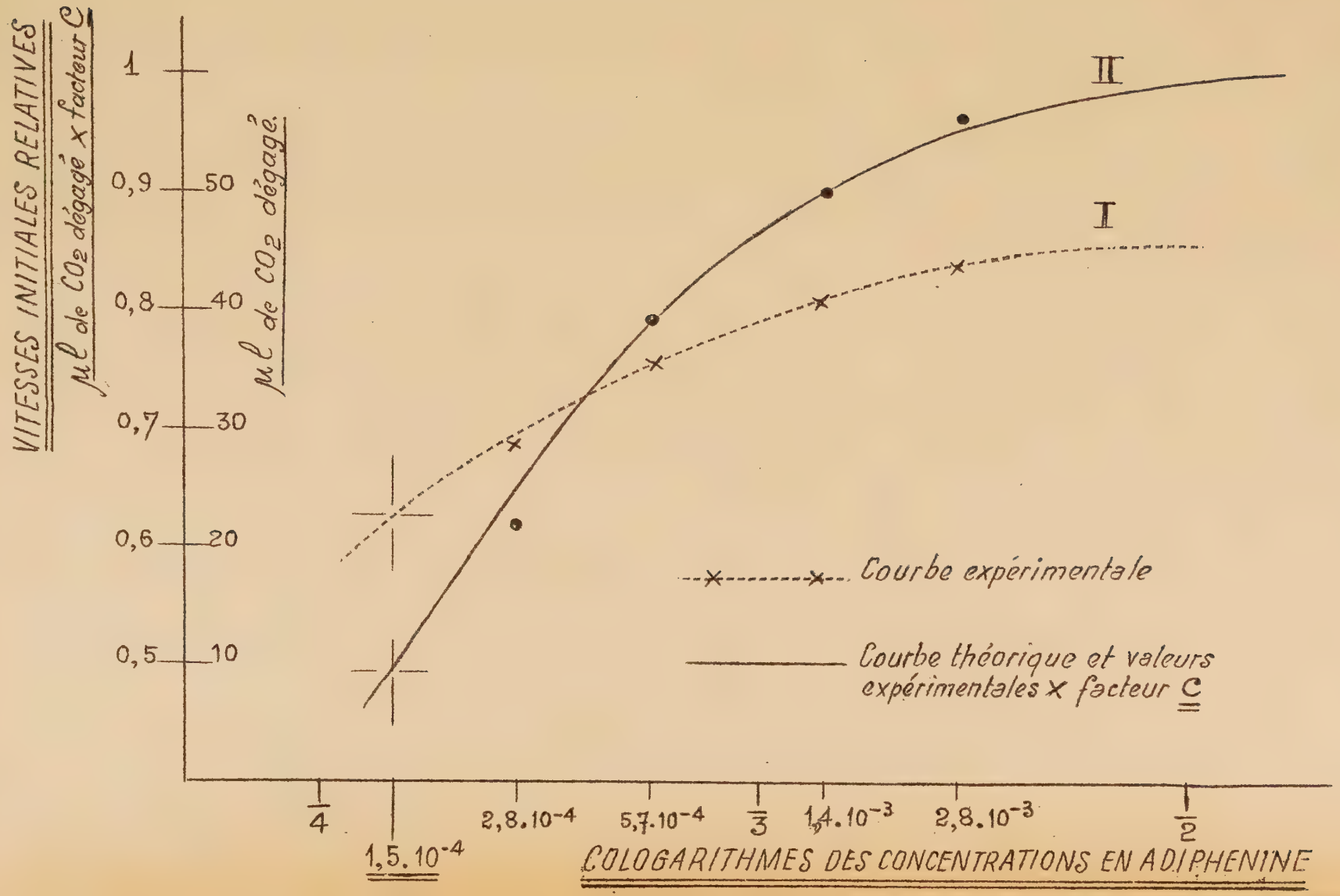
m = concentration moléculaire de l'adiphénine

K_s = constante de dissociation

Concentrations en adiphénine	µl de CO_2 dégagés (valeurs extrapolées)	µl de CO_2 x facteur C	$\frac{100 \times m}{m + K_s}$
			$K_s = 1,5.10^{-4}$
1 p. 1000 = 0,00287 M	44	96,8	95
0,5 - = 0,00143 M	41	90,2	90,5
0,2 - = 0,00057 M	36	79,2	79,3
0,1 - = 0,00028 M	28	61,6	65,1

FIGURE VIII

ACTIVITES ENZYMATIQUES EN FONCTION DU COLOGARITHME DE CONCENTRATION EN ADIPHENINE



DISCUSSION -

Après avoir effectué ce travail, nous avons pris connaissance d'une récente mise au point de WILSON et BERGMANN [104] relative aux constantes de dissociation des complexes enzyme-substrat. D'après ces auteurs quelques réserves doivent être faites au concept de MICHAELIS et de MENTEN. En effet, MICHAELIS émet l'hypothèse que l'activité de la molécule protéique de l'enzyme est associee a la molecule tout entière, alors que depuis, s'est introduit dans l'étude des actions enzymatiques le concept d'un centre actif contenant seulement très peu de groupes fonctionnels. De plus on a admis que l'activité dépendait de l'ionisation de certains groupes dans la molécule de l'enzyme (HALDANE in [104]) et ce concept fut encore étendu plus tard pour inclure l'ionisation du substrat (NORTHROP, WILSTATTER, BULL et CURIE, WALKER et SCHMIDT in [14] . WILSON et BERGMANN en viennent à conclure que " la constante de MICHAELIS est un fait secondaire qui n'a pas de rapport direct avec l'activité de l'enzyme " et montrent la nécessité de tenir compte de la constante d'ionisation des groupes actifs de la molécule enzymatique. Les valeurs des constantes de dissociation calculées d'après MICHAELIS sont alors différentes de celles que l'on obtient en tenant compte de ces nouvelles données.

Quoiqu'il en soit, les constantes de dissociation de différents complexes enzyme-substrat ont été déterminés par de nombreux auteurs, en s'en tenant à la théorie de MICHAELIS et MENTEN. Nous pouvons donc donner à titre indicatif une valeur de l'affinité calculée par cette méthode, dans le seul but de comparaison avec les travaux antérieurs aux nôtres.

CHAPITRE II

INFLUENCE du MILIEU

I - INFLUENCE DU pH -

Bien que les déterminations des activités enzymatiques soient généralement effectuées dans des conditions de pH voisines de celles des milieux biologiques, ou bien soient impérativement fixées par la technique utilisée (cas de la solution tampon bicarbonatée de KREBS - RINGER à pH 7,8 - 7,9 par exemple), l'étude du comportement de l'ènzyme en fonction de la variation du pH permet de préciser les conditions optimum d'action de cet enzyme vis-à-vis d'un substrat déterminé, ces conditions étant le plus souvent spécifiques de l'enzyme.

Cette raison nous a conduit à chercher les valeurs des pH optimum pour les systèmes enzyme-substrat correspondant aux cinq esters du diéthylaminoéthanol que nous étudions.

Nous avons eu recours à deux séries de solutions tampons :

1º- Solution de SÖRENSEN pour les valeurs de pH comprises entre 5 et 8; elles sont constituées par des mélanges de solutions M/15 de phosphate monopotassique et de phosphate disodique.

2º- Solutions d'ATKINS et PANTIN [4] pour les pH compris entre 8 et 10, constituées par des mélanges de solutions d'acide borique, de chlorure de potassium et de carbonate disodique.

Les pH de ces solutions ont été mesurés électrométriquement. Nous avons en outre vérifié qu'à pH 7,5 et à pH 8, la réaction enzymatique n'était pas modifiée par la variation de composition des deux milieux tampons.

Nous avons ensuite opéré comme de coutume, en mettant en contact à 37º des volumes égaux de solutions aqueuses d'esters et de

TABLEAU Nº 29

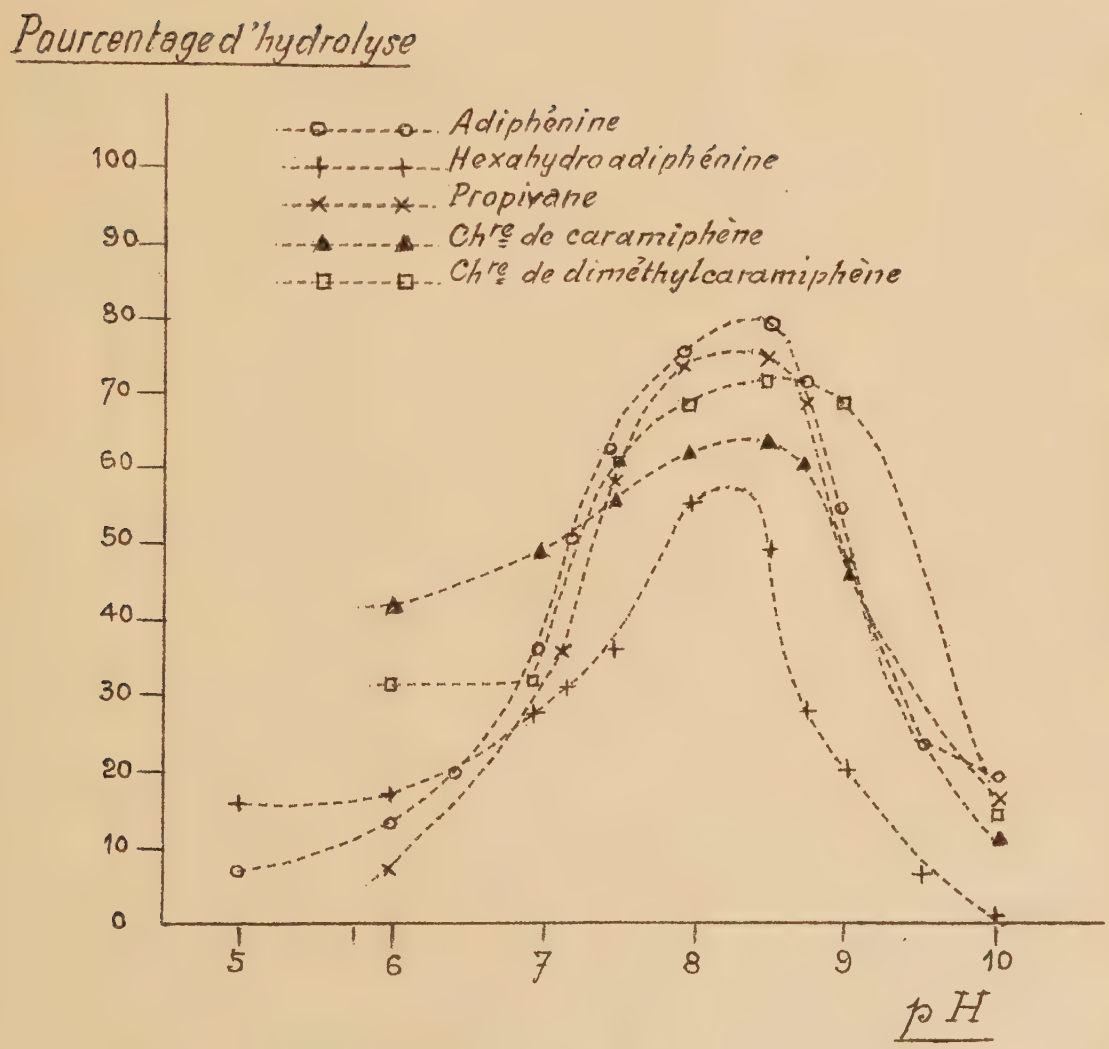
INFLUENCE DU pH

Technique colorimétrique : température 37º; volume réactionnel : 5 ml; volumes égaux de suspensions enzymatiques à différents pH et de solutions aqueuses d'ester à 0,5 p.1000; concentration finale en ester 0,25 p.1000 ($7,2.10^{-4}$M).

Nature de l'ester	Propivane	Adiphénine	Chre de caramiphène	Chre de diméthyl caramiphène	Hexahydro-adiphénine
Poudre de foie de Cobaye	2 mg	10 mg	10 mg	37,5 mg	37,5 mg
Temps de contact	15 minutes	15 minutes	30 minutes	30 minutes	30 minutes
pH	Pourcentage d'hydrolyse				
5		8			16
6	7	13	43		16
7	29	37	49	32	29
7,2	36	50			32
7,5	59	63	56	66	37
8	74	74	63	69	56
8,5	75	80	64	72	50
8,7	69	72	61	71	29
9	50	55	49	70	21
9,6		24			5
10	17	20	11	14	0

FIGURE IX

INFLUENCE du pH



suspensions enzymatiques dans les différents tampons. Dans tous les cas les concentrations en ester ont été identiques. Mais entre deux séries de déterminations portant sur deux esters différents, nous avons fait varier le temps d'incubation et la quantité d'enzyme mise en oeuvre pour augmenter la précision des déterminations. Nous cherchions en effet à avoir des taux d'hydrolyse suffisamment importants, quelle que soit la nature du substrat.

Les dosages des quantités d'esters non décomposés après incubation ont été exécutés en suivant la technique colorimétrique après défécation alcoolo-tartrique.

Les résultats trouvés, compte tenu de l'hydrolyse spontanée des esters aux différents pH, sont condensés dans le tableau № 29 et reproduits graphiquement sur les courbes de la figure IX.

Ils montrent que les valeurs du pH optimum d'action de la diastase ne sont pas exactement les mêmes pour tous les esters mais les écarts trouvés sont très faibles.

Nous pouvons admettre que la valeur du pH optimum est de :

- 8,25 pour l'hexahydroadiphénine,
- 8,50 pour l'adiphénine, le propivane, les chlorures de caramiphène et de diméthylcaramiphène.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par PULVER pour le chlorure de caramiphène, bien que cet auteur ait utilisé une source d'enzyme différente de la nôtre : le sérum de Lapin.

II. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Toutes les mesures d'activité enzymatique dont il a été rendu compte précédemment ont été faites à 37°. Il importait de vérifier si cette condition fixée à l'avance était justifiée. D'autre part la température optimum est aussi une caractéristique enzymatique.

C'est pourquoi nous avons déterminé l'influence de la température sur la quantité d'ester hydrolysé, pour l'adiphénine et l'hexahydrophénine. Nous avons, devant les résultats obtenus, jugé inutile

d'opérer avec les autres esters.

Les conditions des essais ont été analogues à celles indiquées lors de l'étude de l'action du pH, la variable étant ici la température. Le pH des suspensions d'enzyme a toujours été maintenu égal à 7,2 .

Le dosage de l'ester non hydrolysé a été effectué suivant la technique colorimétrique.

Les résultats trouvés sont condensés dans le tableau Nº 30 et transcrits sur le graphique X.

Ces courbes représentent la résultante de deux actions : l'activation de la réaction sous l'action de la chaleur, l'inactivation irréversible de l'enzyme par élévation de la température.

A 12º la vitesse de réaction est très faible. L'optimum de température se trouve au voisinage de 50º. Au-delà, la courbe amorce une chute brusque montrant que l'enzyme doit être complètement détruit un peu au-dessous de 60º.

La température de 37º à laquelle nous opérons habituellement est satisfaisante puisque des écarts de 1º ou 2º ne déterminent que des variations relativement faibles de l'hydrolyse enzymatique.

Notons ici encore, la similitude de nos résultats avec ceux de PULVER qui étudiait l'action de la chaleur sur l'hydrolyse enzymatique du chlorure de caramiphène par le sérum de Lapin.

III.- INFLUENCE DE LA DIALYSE.

L'influence de la dialyse prendrait tout son intérêt si l'on pouvait constater la présence, dans le milieu enzymatique, de substances dialysables qui favorisent, ou au contraire, diminuent l'activité de celui-ci. C'est ce que nous avons cherché à établir pour le sérum de Lapin.

Des sérums d'animaux, ayant une activité très marquée vis-à-vis de l'adiphénine, sont dialysés dans des sacs de cellophane contre

TABLEAU Nº 30

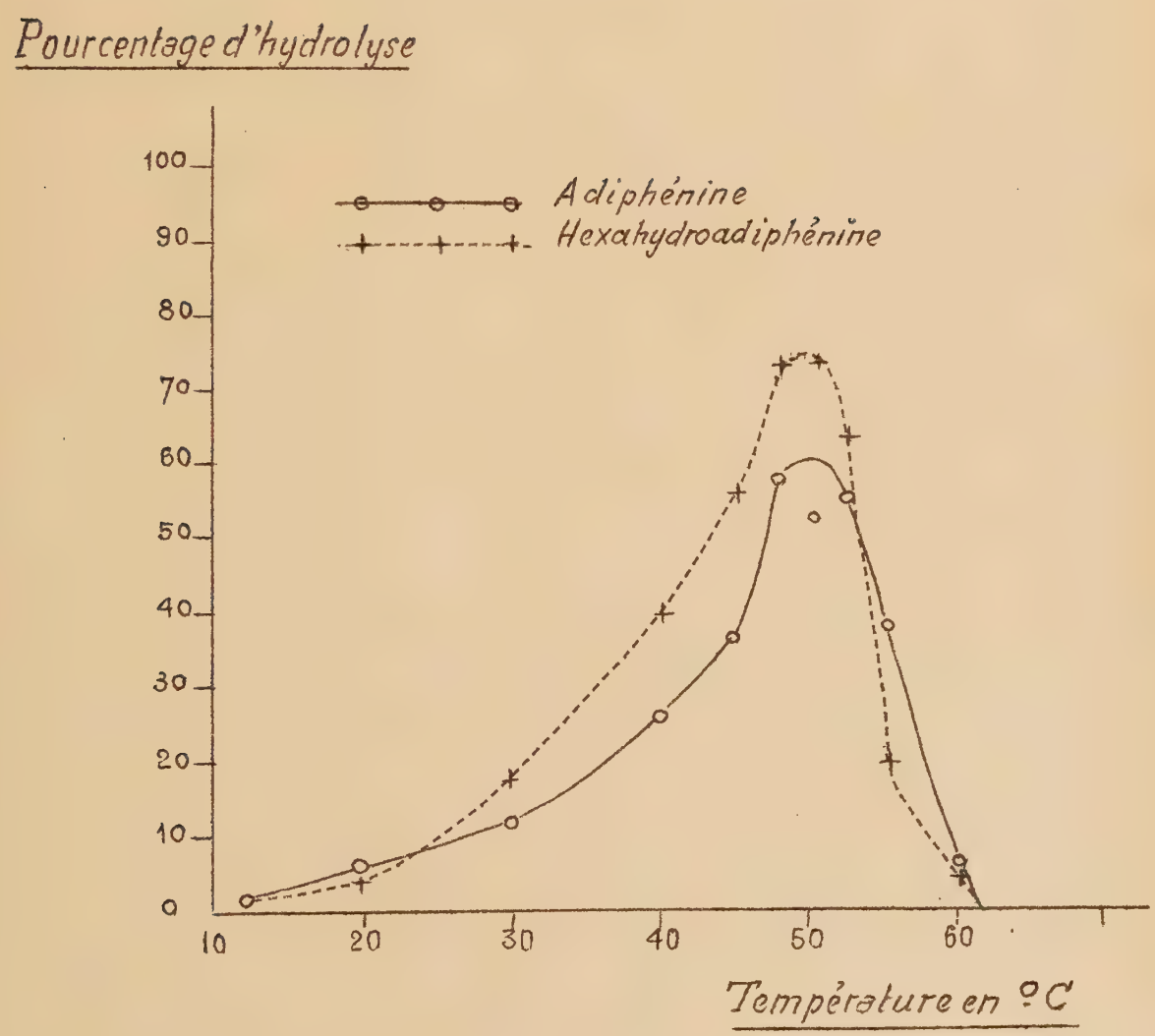
INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Technique colorimétrique : pH : 7,2; volume réactionnel : 5 ml; volumes égaux de suspensions enzymatiques dans le tampon phosphaté M/15 à pH 7,2 et de solutions aqueuses d'ester à 0,5 p.1.000; concentration finale en ester : 0,25 p.1000 ($7,2.10^{-4}$M).

Nature de l'ester	Adiphénine	Hexahydrcadiphénine
Poudre de foie de Cobaye	3,75mg	37,5mg
Temps de contact	15 minutes	30 minutes
Température	Pourcentage d'hydrolyse	
12º	0	0
20º	5	3
30º	10	17
40º	25	38
45º	35	55
47º,5	57	71
50º	51	73
52º5	55	63
55º	37	17
60º	5	4

FIGURE X

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE



une solution de KREBS-RINGER bicarbonatée, à +4º pendant des temps de 24 heures et 36 heures. Les dialyses sont effectuées sous pression. Des échantillons de ces sérums conservés à la même température servent de témoins.

Ainsi qu'on peut le constater par la lecture du tableau Nº 31 l'activité diastasique des sérums après dialyse ne subit aucune variation.

TABLEAU Nº 31

INFLUENCE DE LA DIALYSE SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU SERUM DE LAPIN

Technique manométrique : température : 37º; pH : 7,9;

Réactifs		Concentrations finales
a) sérum dilué dans (c)	0,4ml	160 p.1000
b) solution d'adiphénine dans (c) à 2,5 p.1000	0,5ml	0,50 p.1000 ($1,43.10^{-3}$M)
c) solution de Ringer bicarbonatée	q.s.p. 2,5ml	

Durée de la dialyse	24 heures		24 heures		36 heures		36 heures	
Activités des sérums exprimées en µl de CO_2 dégagés en :	Sérum Nº 1		Sérum Nº 2		Sérum Nº 3		Sérum Nº 3	
	non dialysé	dialysé	non dialysé	dialysé	non dialysé	dialysé	non dialysé	dialysé
5 Minutes	10	9	27	22	12	12	12	13
10 "	24	22	43	38	22	22	35	33
15 "	38	37	44	41	34	33	48	46
20 "	41	42	-	-	44	43	49	47
25 "	-	-	-	-	51	50	-	-

CHAPITRE III

ACTION DE QUELQUES INHIBITEURS

Après avoir déterminé des conditions d'expérimentation convenables par l'étude de l'influence du rapport enzyme -substrat, puis recueilli déjà quelques données relatives à la spécificité de l'enzyme : constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, pH optimum et température optimum, nous avons recherché d'autres éléments de comparaison avec les esterases connues depuis longtemps. Ceci nous a amené à étudier l'action sur l'enzyme de quelques produits dont on connaît le pouvoir inhibiteur vis-à-vis des esterases.

Tous nos essais ont porté sur la destruction de l'adiphénine par la poudre de foie de Cobaye mesurée manométriquement. Des quantités variables des produits dont nous voulions déterminer le pouvoir inhibiteur, étaient introduites avec la diastase dans l'espace annulaire des flacons de Warburg, puis mélangées au substrat après équilibre de température.

I - SALICYLATE D'ESERINE (tableau № 32).

Le salicylate d'ésérine est considéré comme inhibiteur spécifique des cholinesterases et son action se manifeste déjà à la concentration de $1,2.10^{-8}$ (Lévy [68]) - (on sait que cette propriété est exploitée en pharmacologie pour mettre en évidence l'acétylcholine au moyen du muscle dorsal de la sangsue). R. HAZARD et Coll [52] ont montré que cette substance inhibe également la procaïnesterase à concentration voisine de celle qui ralentit ou annihile la pseudocholinesterase. Par contre, elle n'a pas d'action notable sur l'aspirinesterase [99] ni sur l'hydrolyse du chlorure de caramiphène par le sérum de Lapin [87].

De même, nous n'avons constaté aucune action inhibitrice de l'ésérine sur l'hydrolyse de l'adiphénine par la poudre de foie de Cobaye même à la concentration de $2,4.10^{-3}$M.

II - DIFLUOROPHATE -

Le difluorophate est l'un des pluspuissants inhibiteurs de la cholinesterase (HOLMSTEDT [55]) puisque son action se manifeste à une concentration de l'ordre de 1.10^{-9}M (MAZUR et BODANSKY [75]); mais au contraire de l'ésérine, le difluorophate n'est pas spécifique et l'inhibition de cholinesterase par le difluorophate est irréversible (WILSON [103]).

D'après nos essais (Voir tableau № 32) nous voyons que le difluorophate ralentit déjà l'hydrolyse de l'adiphénine à une concentration de $5,4.10^{-7}$M; l'inhibition est totale pour une valeur de $2,1.10^{-5}$M, Le difluorophate est donc ici encore un inhibiteur très puissant, moins cependant que dans le cas de la cholinesterase.

Si nous construisons une courbe donnant le rapport V/V' des vitesses d'hydrolyse de l'adiphénine, avec et sans inhibiteur, en fonction de la concentration de l'inhibiteur, (courbe I, Figure XI) nous remarquons que ce rapport augmente très rapidement et que le tracé obtenu n'est point une droite; ceci nous permet de conclure (AUGUSTINSSON [6]) que l'inhibition de l'enzyme est du type irréversible comme dans le cas de la cholinesterase.

III.- FLUORURE DE SODIUM .

Ce produit est un inhibiteur très général des réactions enzymatiques, il inhibe fortement la destruction enzymatique de l'adiphénine. Les résultats obtenus dans nos essais (tableau № 33) nous montrent en effet que l'inhibition est voisine de 50 p.100 pour une concentration en fluorure de sodium de $2,4.10^{-5}$M, elle atteint 90 p. 100 pour une concentration de $1,2.10^{-3}$M (nous avons vérifié que le fluorure de sodium à la concentration de $2,4.10^{-3}$M inhibe totalement la réaction.

La courbe donnant le rapport V/V' en fonction des concentrations en fluorure de sodium est ici linéaire (courbe II, Figure XI). L'inhibition est donc du type réversible (AUGUSTINSSON [6]).

IV - SULFURE DE SODIUM .

L'inactivation trouvée est de l'ordre de 20 p.100 et de 40 p. 100 pour des teneurs en SNa_2, 9 H_2O respectivement de $4,2.10^{-3}M$ et $8,3.10^{-3}M$ (tableau № 33). Le sulfure de sodium (1) ne retarde donc l'hydrolyse esterasique que faiblement, bien que les doses employées soient grandes. Nous n'avons pu utiliser de plus fortes quantités de cet inhibiteur, car pour une concentration supérieure à $8,3.10^{-3}M$ la réaction ionique de la solution devient très alcaline et les déterminations de l'hydrolyse se trouvent être faussées.

V - CYANURE DE POTASSIUM .

L'étude de l'influence de ce produit sur la réaction enzymatique ne pouvait être menée par la méthode manométrique, puisque celle-ci exige un milieu réactionnel bicarbonaté, très actif vis-à-vis du cyanure de potassium. Nous avons donc utilisé ici la méthode colorimétrique.

Nous n'avons trouvé aucune influence du cyanure de potassium sur l'enzyme même à la concentration de $1,6.10^{-2}M$. Des solutions plus riches en cyanure de potassium sont trop alcalines pour pouvoir être utilisées même en milieu tamponné. Nous noterons que ces résultats ne s'accordent point avec ceux de PULVER : cet auteur estime qu'à une concentration égale à 0,16M, le cyanure inhibe la parpanitesterase du sérum de Lapin d'environ 70 p.100 en 30 minutes.

VI - CITRATE DE SODIUM .

Notons enfin que le citrate de sodium n'influe pas sur l'activité enzymatique à la concentration de 0,5g p.100, concentration à laquelle cet anticoagulant est généralement utilisé.

Nous avons vérifié ce fait au cours de nombreux essais portant sur des sérums d'animaux actifs vis-à-vis de tous les esters.

o°o

(1)- La solution de sulfure de sodium a été préparée extemporanément par barbotage d'hydrogène sulfuré dans une solution sodique. Elle a été ajustée après titrage iodométrique du sulfure en solution.

TABLEAU Nº 33

ACTION DES INHIBITEURS (Suite)

I - Technique manométrique : mêmes conditions que pour le tableau nº 32;

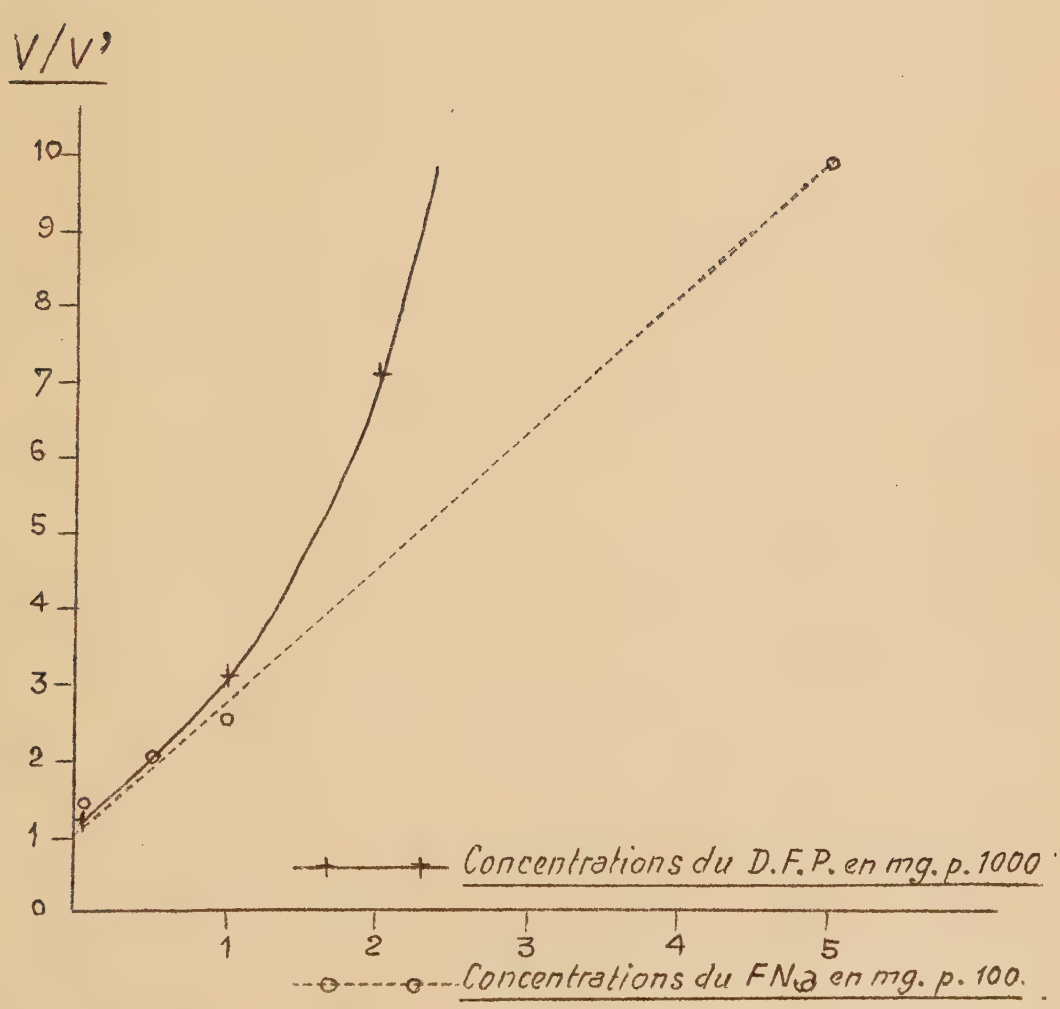
II - Technique colorimétrique (inhibition par CNK) : température : 37º; pH 7,2 ;

Réactifs		Concentrations finales
a) suspension de poudre de foie de Cobaye à 10 p. 1000 dans (d):	1 ml	2 p. 1000
b) solution de l'inhibiteur dans (d) de concentration variable :	0,5 ml	
c) solution d'adiphénine à 0,5 p. 1000 dans (d) :	2,5 ml	0,25 p. 1000 = $7,2.10^{-4}$M
d) solution tampon phosphatée M/15 à pH 7,2 :	1 ml	

F Na	-	0,1 mg % $2,4.10^{-5}$M	0,5 mg % $1,2.10^{-4}$M	1 mg % $2,4.10^{-4}$M	5 mg % $1,2.10^{-3}$ M
µl de CO_2 dégagés après :					
10 minutes	21	10	8	7	2
20 minutes	41	21	17	16	4
30 minutes	52	31	25	21	5
Inhibition %					
10 minutes	-	52	61	66	90
20 minutes	-	49	59	61	90
30 minutes	-	40	52	60	90
$S\ Na_2$, 9 H_2O	-	100 mg % $4,2.10^{-3}$M	200 mg % $8,3.10^{-3}$M		
µl de CO_2 dégagés après :					
10 minutes	21	13	15		
20 minutes	41	32	30		
30 minutes	52	43	30		
Inhibition %					
10 minutes	-	38	28		
20 minutes	-	22	26		
30 Minutes	-	17	42		
C N K	-	1 mg % $1,6.10^{-4}$M	10 mg % $1,6.10^{-3}$M	100 mg % $1,6.10^{-2}$M	
Pourcentage d'hydrolyse de l'adiphénine après 15 minutes	63	62	64	64	

FIGURE XI

ACTIONS INHIBITRICES DU D.F.P. et du F Na à DIVERSES CONCENTRATIONS



CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous nous sommes proposés de donner quelques précisions sur l'hydrolyse enzymatique de l'adiphénine et de quelques autres esters du diéthylaminoéthanol : hexahydroadiphénine, propivane, chlorure de caramiphène, chlorure de diméthylcaramiphène. Après un rappel des recherches antérieures concernant la destruction dans l'organisme des principaux esters qui lui sont étrangers, puis un bref exposé des propriétés pharmacologiques des esters du diéthylaminoéthanol étudiés, nous avons décrit deux techniques utilisées pour l'évaluation de leur hydrolyse diastasique ainsi que les préparations enzymatiques employées.

Nous résumerons brièvement les résultats expérimentaux obtenus et nous nous efforcerons d'en tirer des conclusions d'une portée générale ; enfin nous les comparerons à ceux de nos devanciers.

A.- Résultats expérimentaux

I -

1)- L'examen de la distribution de l'esterase capable d'hydrolyser l'adiphénine dans les organes (foies, reins, poumons, coeurs, cerveaux, sang) d'un certain nombre d'animaux de laboratoire : cobayes, rats, lapins, chiens, montre que, si l'enzyme peut être décelé chez toutes ces espèces, l'on observe de grandes variations individuelles dans une même espèce animale.

D'une manière générale le Cobaye et le Lapin se distinguent des autres animaux par la forte teneur en esterase de leurs organes.

Chez tous les autres animaux, le foie est l'organe le plus riche en enzyme et le seul dont l'activité hydrolysante soit toujours positive. Viennent ensuite le sérum du le rein, puis le poumon qui, chez le Lapin surtout, possède une activité enzymatique non négligeable;

celle du coeur et du cerveau est pratiquement nulle.

Ainsi l'origine hépatique de l'enzyme qui hydrolyse l'adiphénine ne semble pas faire de doute; elle est analogue à celle de la plupart des esterases.

2)- L'hydrolyse comparée des esters permet d'établir que les dérivés voisins de l'adiphénine subissent comme celle-ci l'action lytique du foie de Cobaye, mais avec des différences considérables quant à la vitesse du phénomène. D'après leur résistance relative à la destruction enzymatique, les esters se classent dans l'ordre croissant suivant : propivane, adiphénine, chlorure de caramiphène, chlorure de diméthylcaramiphène, hexahydroadiphénine, ordre qui semble bien être en rapport avec l'encombrement stérique au voisinage de la fonction acide de chacune des molécules. Cette hypothèse est vérifiée dans l'ensemble par le comportement similaire des esters soumis à l'action de la soude, bien que, dans le cas de l'hydrolyse chimique l'adiphénine soit un peu moins stable que le propivane. Il est curieux de constater, par contre, que les vitesses d'hydrolyse enzymatique ne reflètent pas du tout les toxicités des différents spasmolytiques.

3)- Le fractionnement des protéines du sérum ou du plasma de Lapin permet de localiser la protéine qui supporte l'activité enzymatique à l'égard de l'adiphénine, dans la fraction albuminique et, peut-être pour une plus faible part, dans celle des α globulines. De plus, l'augmentation du pouvoir enzymatique après isolement de la fraction active laisse supposer la présence d'un inhibiteur de la réaction diastasique dans l'une ou l'autre des fractions inactives. La nature protéique de cet inhibiteur est confirmée d'autre part par le fait qu'une dialyse prolongée du sérum de Lapin n'en fait point varier l'activité enzymatique. Il faut donc remarquer une fois de plus que l'organisme n'utilise pas au maximum le pouvoir catalytique des enzymes qu'il contient.

Le sang humain normal ou pathologique, pas plus qu'aucun de ses constituants, ne possède d'activité enzymatique vis-à-vis de l'un

quelconque des cinq esters étudiés. L'isolement des fractions albuminiques et globuliniques du plasma humain ne permet pas non plus de déceler d'activité à l'égard de l'adiphénine; l'hydrolyse chimique de celle-ci est au contraire retardée par la présence de sérum humain. Il est donc permis, ici encore, de se demander, si ce fait n'est pas imputable à l'existence d'un inhibiteur de nature protéique agissant, non par l'intermédiaire de la surface active de l'enzyme puisque celui-ci en est absent, mais par protection directe du groupement ester dans la molécule du substrat.

4)- La recherche de l'activité enzymatique au sein de la cellule montre que l'enzyme, très rapidement soluble, n'est pas lié aux éléments figurés de la cellule mais probablement dissous dans le cytoplasme. De plus, les faibles vitesses d'hydrolyse de l'adiphénine constatées lors de perfusions d'organes isolés de Cobaye (foie et rein) laissent entrevoir le rôle de la perméabilité cellulaire dans le processus de destruction du toxique. Ces expériences ne semblent toutefois pas très significatives des phénomènes de détoxication <u>in vivo</u> et soulignent les difficultés que l'on rencontre pour transposer à l'animal vivant les résultats obtenus <u>in vitro</u>.

5)- L'activité enzymatique des organes d'animaux longuement intoxiqués par l'un des spasmolytiques, l'hexahydroadiphénine, n'est point supérieure à celle d'animaux témoins. Il n'est donc pas possible de noter l'apparition de phénomènes d'accoutumance.

6)- La recherche de la localisation des différents spasmolytiques après intoxication expérimentale chez le Cobaye fait apparaître une similitude entre le mécanisme de détoxication de chacun de ces esters chez l'animal vivant dont la grande rapidité est le trait le plus saillant. Les toxiques sont régulièrement localisés dans le poumon pour la plus grande partie, puis dans le foie et le coeur de l'animal. Les quantités de toxiques retrouvées, toujours très faibles, sont en rapport, d'une part avec les différentes vitesses d'hydrolyse des esters, et d'autre part avec les activités enzymatiques de chacun des organes telles qu'elles ont été décelées au moyen d'homogénats. Ceci confirme les ré-

sultats obtenus in vitro et indique la grande rapidité de détoxication de ces spasmolytiques chez l'animal vivant.

II.-

Au moyen d'une préparation diastasique obtenue à partir du foie de Cobaye, nous avons successivement entrepris l'étude de quelques caractéristiques de la réaction enzymatique.

1)- L'étude du rapport enzyme-substrat permet de fixer les valeurs nécessaires à l'établissement de la constante de MICHAELIS pour la réaction d'hydrolyse de l'adiphénine par le foie de Cobaye. Celle-ci est de $1,5.10^{-4}$ ce qui indique une grande affinité entre l'enzyme et l'adiphénine. Cette étude montre en outre que les vitesses de réaction ne sont proportionnelles ni à la concentration de l'enzyme ni à celle du substrat. Ceci souligne les difficultés qu'il y aurait à définir des unités d'activité enzymatique pour l'ensemble des réactions constatées pour chacun des substrats que nous avons utilisés. Seules les vitesses initiales des réactions sont parfaitement significatives, mais leurs déterminations expérimentales appliquées aux diverses sources d'enzyme auraient été de longue durée et de peu d'intérêt. Pour cette raison, il nous a semblé logique de ne présenter que les résultats directement fournis par des expériences réalisées dans des conditions identiques, sans chercher à les rapporter à des unités arbitraires, de temps, de poids ou de volume.

2)- La recherche des conditions optimum d'action de l'enzyme révèle que celles-ci sont identiques pour l'ensemble des esters étudiés. La zone optimum de pH se situe aux environs de 8,25-8,50 et la température optimum est 50°. Ces conditions sont donc bien différentes de celles dans lesquelles se trouve l'enzyme in vivo.

3)- L'ésérine, le cyanure de potassium, le citrate de sodium, n'ont aucune influence sur l'activité de l'enzyme hydrolysant l'adiphénine, mais il n'en est pas de même pour le difluorophate et le fluorure de sodium qui sont des inhibiteurs puissants de la réaction: l'action du difluorophate se manifeste déjà à la concentration de $5,4.10^{-7}$M et le

fluorure de sodium inhibe de 50 p.100 la réaction enzymatique à une concentration de $2,4.10^{-5}$M. Le sulfure de sodium retarde également l'hydrolyse mais à des concentrations beaucoup plus importantes atteignant $4,2.10^{-3}$M à $8,3.10^{-3}$M pour une inhibition de 20 à 40 p. 100.

III.-

Il apparaît dans cette étude une analogie frappante et constante entre les conditions de destruction diastasique des cinq esters du diéthylaminoéthanol. La localisation des activités enzymatiques est la même quel que soit l'ester considéré. Nous ne l'avons vérifié nous-mêmes directement que pour le foie et le sang d'un certain nombre de cobayes ainsi que pour le sang humain. Mais le fait que PULVER [87] et DELGA et ANDRIEU [22] aient trouvé chez d'autres animaux et pour le chlorure de caramiphène des résultats analogues aux nôtres, permet de penser qu'il en est bien ainsi. De plus, il est remarquable que les caractéristiques de la réaction enzymatique, pH et température optimum, nature et intensité d'action des inhibiteurs, soient les mêmes pour tous les esters quelle que soit la source de l'enzyme utilisée : poudre stabilisée de foie de Cobaye ou sérum de Lapin.

L'on peut donc être assuré de l'unité du ferment qui préside à toutes les réactions observées et conclure à son identité avec la parpanitesterase de PULVER. Cet enzyme n'a donc point de spécificité étroite et son action doit pouvoir se manifester à l'égard d'un certain nombre d'esters diéthylaminoéthyliques. Nous allons voir qu'il semble difficile au contraire de la rapprocher de celle d'autres esterases.

Notons auparavant que le choix de l'adiphénine en tant que ubstrat ne pouvait qu'apporter plus de sensibilité aux déterminations de l'activité de cet enzyme, puisque cet ester est un des plus labiles.

B - Comparaison avec les autres esterases

Nous avons mis en parallèle dans le tableau № 34 d'une part la distribution des différentes esterases dans les organes d'animaux les plus actifs, et d'autre part leurs caractéristiques. Il nous sera ainsi

possible de comparer successivement à chacune d'elles l'enzyme que nous avons étudié.

1)- Cholinesterase - Il n'est guère possible de rapprocher l'enzyme étudié des cholinesterases. En effet l'action de celles-ci sur l'acétylcholine ou les esters de la choline voisins, se manifeste avec une grande intensité dans des tissus tels que le sérum humain, pour la pseudo-cholinesterase, ou, pour la cholinesterase vraie, dans les tissus nerveux de l'Homme et de nombreux animaux; ces tissus sont totalement dépourvus d'activité enzymatique à l'égard de l'adiphénine. Au contraire, nous avons constaté que les préparations de foie de Cobaye stabilisées par traitement acétonique n'avaient pas non plus d'activité hydrolysante à l'égard de l'acétylcholine. De plus les cholinesterases sont spécifiquement inhibées par la présence de salicylate d'ésérine à de très faibles concentrations et on a vu que cet alcaloïde n'empêchait pas la destruction enzymatique de l'adiphénine, même à très haute concentration.

2)- Procaïnesterase - Il en est de même pour la procaïnesterase puisque celle-ci semble très voisine de la pseudo-cholinesterase et se trouve notamment dans le sérum humain; elle est de plus fortement inhibée par l'ésérine.

3)- Aspirinesterase - La comparaison avec l'aspirinesterase montre encore une profonde dissemblance. Cet enzyme est retrouvé dans le sérum du sang humain et subit l'action inhibitrice de l'atoxyl à l'inverse de la parpanitesterase (PULVER [87]); mais il se montre insensible à l'action du difluorophate , alors que ce produit est un inhibiteur très puissant de l'enzyme qui hydrolyse l'adiphénine. Leur pH optimum d'action est en outre très différent.

4)- Tropanolesterase - Si la tropanolesterase a une distribution très voisine, un pH, et une température optimum très proches de ceux de l'esterase que nous étudions, des différences les séparent néanmoins : l'action inhibitrice de l'ésérine, faible pour l'une est nulle pour l'autre. En outre la tropanolesterase est facilement dénaturée par

l'acétone (LEVY [69]) alors que nous avons pu utiliser ce solvant pour stabiliser l'enzyme hépatique du Cobaye sans noter de perte d'activité vis-à-vis de l'adiphénine ou des autres esters. Enfin la tropanol-.esterase est entièrement précipitée du sérum de Lapin par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation avec les α et β globulines. Nous avons retrouvé au contraire l'enzyme qui nous occupe, dans la même fraction que les albumines et pour une faible part seulement, avec les α globulines.

5)- Autres esterases - Le ferment hydrolysant l'adiphénine et le chlorure de caramiphène (parpanit) insensible à l'égard de l'atoxyl et du citrate de sodium doit enfin être nettement séparé de la lipase sérique et d'autres aliesterases (RICHTER et CROFT [88]) qui se trouvent dans le sérum, et hydrolysent de façon non spécifique non seulement des esters aliphatiques et des glycérides, mais aussi des substrats chromatogènes comme les acylesters du paranitrophénol (in PULVER [87]).

Il n'est donc guère possible d'identifier l'enzyme de l'adiphénine et des esters voisins à l'une ou l'autre des esterases connues jusqu'ici. Et si la dénomination de "parpanitesterase" proposée par PULVER peut lui être gardée en raison de son antériorité, on ne devra pas oublier que la spécificité de cet enzyme n'est pas limitée à cet antiparkinsonien .

TABLEAU Nº 34

	Acétyl choline-sterase	Procaïne esterase	Aspirine esterase	Tropanol esterase	Héroïne désacétylase	Enzyme étudié et Parpanit esterase	Sérum lipase
Distribution							
Sérum humain	+++	+++	+	0	++	0	++
Sérum de Lapin	++	+	+	+++	++	++	
Foie de Lapin	+++	++	++	++	+++	+++	
Cerveau de Lapin	++++			0	++	0	
Sérum de Cobaye	++	+	++	0	++	++	
Foie de Cobaye	+++	++	+++	++	+++	+++	
Inhibition par							
Eséríne	+++	+++	0	+(0)	++	0	+
Difluorophate	+++	+++	0			+++	
Na F	++	++	+	++		++	+
C N K	+	+	0			0	
Citrate Na		très faible				0	augmentation de l'activité
Atoxyl			+			0	++
Température max.	56º			38º-45º		50º	
pH max.	7,5-8	7	5 et 7,8	8		8,25-8,50	8
Constante de dissociation K_s	$1,1.10^{-3}$ $2.75.10^{-3}$ A.C.H.-Sérum humain			6.10^{-5} $7,8\ 10^{-4}$ Atropine-Sérum Lapin		$1,5.10^{-4}$ Adiphénine-Foie Cobaye	

RÉSUMÉ

Au cours de ce travail, nous avons étudié la destruction enzymatique de l'adiphénine et de quelques esters du diéthylaminoéthanol.

Nous avons établi les points suivants :

1º- Un enzyme, d'origine probablement hépatique, hydrolyse avec des vitesses variables une série de spasmolytiques synthétiques de constitutions chimiques très voisines. Les différentes vitesses d'hydrolyse sont liées à l'encombrement stérique de la molécule au voisinage de la fonction ester.

2º- La distribution de l'enzyme dans différents tissus d'animaux d'espèces variées a été donnée. L'enzyme est absent du sang humain.

3º- Dans le sérum ou le plasma de Lapin, l'enzyme a été décelé dans la fraction constituée par les albumines et, pour une faible part, dans celle des α globulines.

4º- Dans la cellule, l'enzyme très soluble, n'est pas lié aux éléments figurés mais semble dissous dans le cytoplasme. Des perfusions d'organes de cobayes ont montré que l'action de l'enzyme y est moins prononcée que dans le cas des pulpes d'organes.

5º- Il n'a pu être décelé de phénomènes d'accoutumance chez l'animal.

6º- La recherche des spasmolytiques après intoxication brutale chez le Cobaye montre la répartition de ceux-ci dans les différents organes de l'animal et indique la grande rapidité de la détoxication chez l'animal vivant.

7º- Les caractéristiques de la réaction enzymatique ont été établies:

- -influence de la concentration du substrat et de l'enzyme,

  constante de dissociation du complexe adiphénine-enzyme hépatique du Cobaye,

- pH optimum ,

- température optimum ,

- inhibition de la réaction.

8°- L'enzyme étudié est identique à celui qui a été désigné par PULVER [87] sous le nom de "parpanitesterase", nom que nous lui conserverons bien qu'il tende à lui conférer une spécificité étroite qui n'existe pas. Cet enzyme est nettement différent des autres esterases connues. Il semble donc que dans l'état actuel de nos connaissances, l'on puisse le considérer comme spécifique d'une série d'esters du diéthylaminoéthanol.

V U
PERMIS D'IMPRIMER

LE RECTEUR
de l'ACADEMIE de PARIS

Jean SARRAILH

V U le DOYEN

R. FABRE

V U le PRESIDENT de THESE

G. VALETTE

B I B L I O G R A P H I E

1 - AMMON (R.) - Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1933, 233, 486.

2 - ARDRY (R.) - Communication privée, 1955, en partie publiée in ARDRY (R.)- Thérapie, 1954, 9, 182.

3 - ARIENS (E.J.)- Arch. intern. Pharmacodyn., 1954, 99, 32.

4 - ATKINS et PANTIN in BAMANN (E.) et MYRBÄCK (K.)- Die Methoden der Fermentforshung, Leipzig, 1941, 1, 783.

5 - AUERBACH (M.E.)- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 1943, 15, 492.

6 - AUGUSTINSSON (K.B.)- Acta Physiol. Scand., 1948, 15, Suppl. 52, 1.

7 - AUGUSTINSSON (K.B.)- in SUMNER (J.B.) et MYRBÄCK (K.)- The Enzymes, Academie Press, N.Y, 1951, 6, part. 1.

8 - AUGUSTINSSON (K.B.)- IIème Congrès International de Biochimie, Paris, 1952, 229

9 - AUGUSTINSSON (K.B.) et HEIMBÜRGER (G.)- Acta Chem. Scand. 1954, 8 753.

10 - BASTIDE (P.) et DASTUGUE (G.) - Travaux Soc.Pharm., Montpellier, 1953, 13, 178.

11 - BÉNARD (H.), GAJDOS (A.) et Mme GAJDOS-TOROCK (M.)- C.R. Soc. Biol., 1948, 142, 1372.

12 - BERNHEIM (F.) et BERNHEIM (M.L.C.)- J. Pharm. Exp. Ther.,1938, 64,209.

13 - BERHNEIM (F.) et BERNHEIM (M.L.C.)- J. Pharm. Exp. Ther.,1945, 85, 74.

14 - BONAMY (C.).- Thèse Doct. Pharm., Paris 1950.

15 - BRODIE (B.B.), ARONOW (L.) et AXELROD (J.)- J. Pharm. Exp. Ther., 1952, 106, 200.

16 - BRODIE (B.B.) et UDENFRIEND (S.).- J. Biol. Chem., 1945, 158, 705.

17 - BRODIE (B.B.), UDENFRIEND (S.) et DILL (W.A.).- J. Biol. Chem., 1947 168, 335.

I8 - COHN (E.J.) et coll. - J.Amer.Chem. Soc.,I946, 68, 459.
I9 - COURTOIS (J.) - Exposés annuels de Biochimie Médicale,I947, 7, I65.
20 - COTZIAS (G.C.) et DOLE (V.P.) - J.Biol.Chem.,I952, I96, 235.
2I - DASTUGUE (G.) et FAVIER (R.) - Thérapie, I95I, 6, 397.
22 - DELGA (J.) et ANDRIEU (B.) - Thérapie, I95I, 6, 460.
23 - DILL (W.A.) et GLAZKO (A.J.) - J.Biol.Chem., I949, I79, 395.
24 - DOMENJOZ (R.) - J.suisse de Méd., I946, 50, I282.
25 - DURICK (F.), KING Jr. (J.S.),WARE (P.A.) et CRONHEIM (G.)-J.Amer. Pharm.Ass., I950, 39, 680.
26 - ELLIS (S.) - J. Pharm.Exp.Ther., I947, 9I, 370.
27 - FABRE (R.) et TRUHAUT (R.) - Ann.Méd.lég., I949, 30, 233.
28 - FIESSINGER (N.), HAZARD (R.),RAVASSE (J.) et CHARLES (G.) - Bull.Acad.Méd., I945, I29, 558.
29 - FISHER (A.L?) et LONG (J.P.) - J. Pharm.Exp.Ther., I953, I07, 24I.
30 - FISHMAN (W.H.) - J. Biol.Chem., I938, I23, XXXVI.
3I - FLEISCHMANN (P.) - Arch.f.exp.Pathol.u.Pharmakol., I9I0,62, 5I8.
32 - GANZIN (M.), MACHEBOEUF (M.) et REBEYROTTE (P.) - Bull.Soc.Chim.Biol., I952, 34, 26.
33 - GLASSON (B.) - Thèse de chimie pharmacologique, Genève, I952.
34 - GLICK (D.) - Biochem. J., I937, 3I, 52I.
35 - GLICK (D.)-J. Biol.Chem., I940, I34, 6I7.
36 - GLICK (D.), GLAUBACH (S.) et MOORE (D.H.) - J.Biol.Chem., I942,I44,525.
37 - GREEN (D.E.) et NORDMANN (J.)-Exposés annuels de Biochimie Médicale, I953, I5, 53.
38 - HALEY (T.J.) et BASSIN (M.) - J.Pharm.Exp.Ther., I95I, I03, 345.
39 - HALPERN (B.N.) - C.R.Soc.Biol., I937, I26, 678.
40 - HALPERN (B.N.)-Arch.intern.Pharmacodyn.,I938, 59, I49.
4I - HAZARD (R.) - Presse Méd.,I948, 44, 529.
42 - HAZARD (R.) et BONAMY (C.) - C.R. Soc.Biol., I948, I42, 743.
43 - HAZARD (R.),BONAMY (C.) et CORNEC (A.) - Presse Méd.,I949, 77, II33.
44 - HAZARD (R.),CORNEC (A.) et PIGNARD (P.) - C.R. Soc.Biol.,I950, I44 , 356.

45 - HAZARD (R.), CORTEGGIANI (E.) et CORNEC (A.) - C.R.Soc.Biol., I949, I43, 605.

46 - HAZARD (R.) et DEROT (M.) - Presse Méd., I949, 8, II4.

47 - HAZARD (R.), DEROT (M.) et Mme PICARD-JACQUET - Bull.Soc.Méd.Hôp., I948, 30, I033.

48 - HAZARD (R.) et LAFITTE (A.) - Presse Méd., I953, I4, 285.

49 - HAZARD (R.), NICAUD (P.) et LAFITTE (A.) - Presse Méd., I949, 8, 113.

50 - HAZARD (R.), NICAUD (P.), LAFITTE (A.) et MAYOLY (G.) - Bull. Acad. Méd., I948, I32, 434.

5I - HAZARD (R.), NICAUD (P.), LAFITTE (A.) et MAYOLY (G.) - Bull.Soc. Méd. Hôp., I949, 9, 3II et 3I7.

52 - HAZARD (R.), PIGNARD (P.) et CORNEC (A.) - C.R.Soc.Biol., I949, I43 I425.

53 - HAZARD (R.) et RAVASSE (J.) - C.R.Soc.Biol., I945, I39, I3, et HAZARD (R.) et RAVASSE (J.) - Bull.Acad.Méd., I945, I29, 585.

54 - HECKEL (E.) - C.R. Acad.Sc., I875, 80, I608.

55 - HOLMSTEDT (B.O.) - Acta.Physiol.Scand., I95I, 25, Supp.90.

56 - JOACHIMOGLU (G.) et KLISSIUNIS (N.) - J. Suisse de Méd., I948, 78, 5I9.

57 - KELLER (R.E.) et ELLENBOGEN (W.C.) - J.Pharm.Exp.Ther., I952, I06, 77.

58 - KISCH (B.), KOSTER (H.) et STRAUSS (E.) - Exp. Med.and Surg., I943; I, 51.

59 - KISCH (B.) et STRAUSS (E.) - Exp.Med.and Surg., I943, 1, 66 et 367.

60 - KOELLE (G.B.) - Biochem J., I953, 53, 2I7.

6I - KOSTER (H.) et KISCH (B.) - Exp.Med.and Surg., I943, 1, 7I.

62 - LA BARRE (J.) - J.Pharm.Exp.Ther., I925, 26, 259.

63 - LEHMAN (R.A.) et AITKEN (T.) - J. Labor.and clinical Med., I943, 28, 787.

64 - LESPAGNOL (A.) et BAR (D.) - Bull.Soc.Chim., I938, 2, I360.

65 - LESPAGNOL (A.) et BAR (D.) - Bull.Soc.Pharm. Lille, I948, N°I, 20.

66 - LESPAGNOL (A.), BATTEUR (J.) et LESPAGNOL (Ch.) - Thérapie, I95I, 6, I25.

67 - LEVY (J.) - J. Physiol., I947, 39, 4I3.
68 - LEVY (J.) - J. Physiol., I95I, 43, I03.
69 - LEVY (J.) - J. Physiol., I95I, 43, I27.
70 - LEVY (J.) et MICHEL (E.) - C.R. Soc. Biol., I938, I27, I2.
7I - LEVY (J.) et MICHEL (E.) - C.R. Soc. Biol., I938, I29, 820.
72 - LEVY (J.) et MICHEL (E.) - Bull. Soc. Chim.Biol., I945, 27, 570.
73 - MACHEBOEUF (M.), REBEYROTTE (P.) et BRUNERIE (M.) - Bull.Soc.Chim. Biol., I95I, 33, I543.
73 bis - MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.)-Journ.of Physiol., I938, 92, 37.
74 - MAZUR (A.) - J. Biol. Chem., I946, I64, 27I.
75 - MAZUR (A.) et BODANSKY (O.) - J.Biol.Chem., I946, I63, 26I.
76 - MEIER (R.) Klin.Wschr., I936, 39, I403.
77 - MEIER (R.) et HOFFMANN (K.)-Helv.Med.Acta, I940, 7, suppl.VI,1.
78 - METZNER (R.)-Arch. f. Exp. Pathol. u. Pharmakol., I9I2, 68, 110.
79 - MICHAELIS (L.) et MENTEN (M.L.) - Biochem.Zeitschr., I9I3, 49, 333.
80 - NACHMANSOHN (D.)-Bull.Soc.Chim.Biol., I939, 2I, 76I.
8I - ONCLEY (J.L.) et coll. - J.Amer.Chem.Soc., I949, 7I, 54I.
82 - PETERS (R.A.) - Proc.Roy.Soc.Med., I948, 4I, 78I.
83 - PETERS (R.A.), SINCLAIR (H.M.) et THOMPSON (R.H.S.) - Biochem.J., I946, 40, 5I6.
84 - POLONOVSKY (M.) et coll. - Biochimie Médicale, Masson et Cie éd., Paris, I952, 229.
85 - POTTER (V.R.) et ELVEHJEM (C.A.) - J. Biol.Chem., I936, 114, 495.
86 - PRUDHOMME (R.O.) - J.P.C., I940, 9ème série, 1, 8.
87 - PULVER (R.) - Arch.intern.Pharmacodyn., I95I, 86, I85.
88 - RICHTER (D.) et CROFT (P.G.) - Biochem.J., I942, 36, 746.
89 - SOBOTKA (H.) et GLICK (D.) - J.Biol.Chem., I934, I05, I99.
90 - STOCKEN (L.A.) et THOMPSON (R.H.S.)-Biochem. J., I946, 40, 529.
9I - SURGENOR (D.M.), STRONG (L.E.), TAYLOR (H.L.), GORDON Jr. (R.S.) et GIBSON (D.M.) - J.Amer.Chem.Soc., I949, 7I, I223.

92 - TRIPOD (J.)-Brit.Pharmacol., I949, 4, 323.

93 - TRIPOD (J.)-Helv.Physiol.Acta., I949, 7, I35.

94 - TRIPOD (J.)-Helv.Physiol.Acta., I952, I0, 403.

95 - TRUHAUT (R.)-Ann. Pharm.Fr., I953, 11, 46.

96 - UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.) et STAUFFER (J.F.) - Manometric Techniques and Tissue Metabolism, Burgess Publish.Co éd.Mineapolis I949.

97 - VALETTE (G.), COHEN (Y.) et BURKARD (W.) - C.R. Soc.Biol., I954 I48, I762.

98 - VANDELLI (I.) et SCALTRITI (F.) - Boll.Soc.Ital.Biol.sper., I943, I8 77.

99 - VINCENT -(D.) et LAGREU (R.) - Bull.Soc.Chim.Biol., I949, 3I, 2I6.

I00 - WILLIAMS (R.T.) - Detoxication Mechanism, Chapaman et Hall éd. Londres, I947.

I0I - WILSON (I.B.) - J.Biol.Chem., I95I, I90, 111.

I02 - WILSON (I.B.) - J. Biol.Chem., I952, I99, 113.

I03 - WILSON (I.B.) et BERGMANN (F.) - J. Biol.Chem.,I950, I85, 479.

I04 - WILSON (I.B.) et BERGMANN (F.)-J.Biol.Chem., I950, I86, 683.

I05 - WILSON (I.B.) et MEISLICH (E.K.) - J.Amer.Chem.Soc.,I953, 75, 4628.

I06 - WILSON (I.B.),BERGMANN (F.) et NACHMANSOHN (D.) - J.Biol.Chem.,I950, I86, 78I.

I07 - WRIGHT (C.I.) - J.Pharm. Exp.Ther., I94I, 7I, I64.

I08 - WRIGHT (C.I.) -.J. Pharm. Exp. Ther., I942, 75, 328.

I09 - ZUNZ (E.) - Eléments de Pharmacodynamie générale, Masson et Cie éd., Paris, I930.

TABLE DES MATIERES

Pages

AVANT-PROPOS .....

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : Exposé bibliographique 5

Chapitre I - Travaux antérieurs 5

1. Procaïnesterase 5
2. Aspirinesterase 7
3. Tropanolesterase 8
4. Héroïne-désacétylase 10
5. Parpanitesterase 11

Chapitre II - Produits étudiés 13

1. Constitution chimique 13
2. Caractères physicochimiques 14
3. Propriétés pharmacologiques 15
4. Toxicité 16

DEUXIEME PARTIE : Techniques utilisées 19

Chapitre I - Méthodes de dosage 19

1. Méthode colorimétrique 20
2. Méthode manométrique 26

Chapitre II - Préparations enzymatiques 30

1. Tissus liquides 30
2. Suspensions d'organe frais 30
3. Préparation enzymatique stable 31

TROISIEME PARTIE : Hydrolyse enzymatique in vitro des spasmolytiques - Localisation de l'activité 34

Chapitre I - Destruction de l'adiphénine par quelques tissus d'espèces animales différentes 35

1. Cobaye 36
2. Rat 36
3. Lapin 36
4. Chien 37

Pages

Chapitre II - Hydrolyse enzymatique et chimique de quelques esters du diéthylaminoéthanol 44

1. Hydrolyse comparée des esters par l'esterase du foie de Cobaye 44
   a) Hydrolyse des esters par des homogénats de foie de Cobaye 45
   b) Hydrolyse des esters par une poudre acétonique de foie de Cobaye 45
2. Hydrolyse comparée des esters par la soude 47

Chapitre III - Recherches spéciales relatives à l'action du sérum sur les esters étudiés 55

1. Activités de diverses fractions protéiniques de sérum hydrolysant l'adiphénine 56
   a) Fractions sériques obtenues par relargage 57
   b) Fractions plasmatiques obtenues par précipitation à l'éthanol 59

2. Activité enzymatique du sang humain 64
   a) Destruction de l'adiphénine 64
   b) Destruction des autres esters 67
   c) Recherche de l'enzyme dans différentes fractions plasmatiques 68

Chapitre IV - Recherches sur l'activité de l'enzyme au sein de la cellule 69

1. Action des extraits solubles d'organe 69
2. Destruction de l'adiphénine au cours de perfusions d'organes isolés de Cobayes 72
   a) Perfusions de foies 72
   b) Perfusions de reins 76

Chapitre V - Recherches sur la formation d'enzymes d'adaptation 80

Chapitre VI - Répartition des spasmolytiques à la suite d'intoxications expérimentales 83

QUATRIEME PARTIE : Les caractéristiques de l'enzyme 90

Chapitre I - Rapport enzyme-substrat. Détermination de la constante de dissociation 90

1. Influence de la concentration en enzyme 91
2. Influence de la concentration en substrat. Constante de dissociation 92

Pages

Chapitre II - Influence du milieu 102

1. Influence du pH 102
2. Influence de la température 105
3. Influence de la dialyse 106

Chapitre III - Action de quelques inhibiteurs 110

1. Salicylate d'ésérine 110
2. Difluorophate 111
3. Fluorure de sodium 111
4. Sulfure de sodium 112
5. Cyanure de potassium 112
6. Citrate de sodium 112

CONCLUSIONS 117

A/ Résultats expérimentaux 117
B/ Comparaisons avec les autres esterases 121

RESUME 125

BIBLIOGRAPHIE 127